

**Kopplungsuntersuchungen zur Identifizierung
Atherosklerose assoziierter Genorte und Atherosklerose-
modifizierender Faktoren in LDL-Rezeptor defizienten
BALB/c und C57BL/6 Mäusen**

Publikationsdissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Simon Sündermann
geb. am 20.11.1979 in Tübingen

angefertigt am:

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie
und Molekulare Diagnostik der Universität Leipzig

Betreuer:

1. Prof. Dr. med. Daniel Teupser
2. Prof. Dr. med. Joachim Thiery

Beschluss über die Verleihung des Doktrogrades vom: 17.07.2012

Inhalt:		I
1	Bibliographische Zusammenfassung	II
2	Einführung	1
2.1	Epidemiologie der Atherosklerose	1
2.2	Pathogenese der Atherosklerose	1
2.3	Umweltbedingte und genetische Einflüsse auf die Atherosklerose	3
2.4	Identifizierung von Genen der Atherosklerose- disposition im Mausmodell	4
2.4.1	Mausmodelle der Atherosklerosedisposition	4
2.4.1.1	Untersuchung von Kandidatengenen der Atherosklerose im Mausmodell	6
2.4.1.2	Hypothesenfreie Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose im Mausmodell	6
2.5	Arbeitshypothese und Zielsetzung	10
3	Zusammenfassung	11
4	Literaturverzeichnis	17
5	Manuskript: „Co-segregation of atherosclerosis and intermediate lipid phenotypes on Chr 2 in an intercross of C57BL/6 and BALBc/ByJ LDLR ^{-/-} mice“	23
I	Anlagen	
I.1	Selbstständigkeitserklärung	a
I.2	Publikationen	b
I.3	Danksagung	c

1 Bibliographische Beschreibung

Sündermann, Simon

Kopplungsuntersuchungen zur Identifizierung Atherosklerose assoziierter Genorte und Atherosklerose modifizierender Faktoren in LDL-Rezeptor defizienten BALB/c und C57BL/6 Mäusen

Universität Leipzig, Dissertation

63 S.¹, 54 Lit.², 5 Anlagen, 1 Abbildung

Referat:

Atherosklerotisch bedingte Herz-Kreislaufkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Die vorliegende Arbeit befasst sich in einem Mausmodell mit der Identifikation neuer Genorte, welche die Ausprägung der Atherosklerose und deren Kofaktoren beeinflussen. Zu diesem Zweck wurde eine Kopplungsuntersuchung in einer Kreuzung Atherosklerose-empfindlicher C57BL/6 und BALB/c Mäuse auf dem LDL-Rezeptor defizienten Hintergrund durchgeführt. Außer der Größe der atherosklerotischen Läsionen wurden 61 weitere Phänotypen bestimmt. Als Hauptergebnis konnte ein neuer Genlocus auf dem proximalen Chromosom 2 identifiziert werden, welcher einen Einfluss auf die Größe der atherosklerotischen Läsionen an der Aortenwurzel hat. Des Weiteren zeigte sich eine Co-Segregation von Lipoproteinen (Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL) Cholesterin und High-Density Lipoprotein (HDL) Cholesterin mit diesem Locus sowie eine Korrelation dieser Lipide mit der Läsionsgröße. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Effekt des Chromosom 2 Locus auf die Atherosklerose durch genetische Faktoren des Fettstoffwechsels bedingt ist. Weitere Experimente sind notwendig um den QTL weiter einzuengen und die verantwortlichen Gene zu identifizieren.

¹ Seitenzahl insgesamt

² Zahl der insgesamt im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben

2 Einführung

2.1 Epidemiologie der Atherosklerose

Atherosklerotisch bedingte Herz-Kreislaferkrankungen stellen weltweit eine der häufigsten Todesursache dar [1]. Ursächlich hierfür ist die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen in den Koronararterien, die zu der klinischen Manifestation der koronaren Herzerkrankung und schließlich zum Herzinfarkt führen können. Auch andere Organe können durch atherosklerotische Veränderungen in den zuführenden Gefäßen gefährdet sein. Zum Beispiel kann Atherosklerose in den hirnversorgenden Arterien zu zerebraler Ischämie und nachfolgend zum Schlaganfall führen [2,3]. Die Atherosklerose ist außerdem ursächlich für die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die Nierenarterienstenose und das Bauchaortenaneurysma. Auch diese Ausprägungen der Krankheit sind mit einer hohen Morbidität und Mortalität verknüpft. Durch atherosklerotisch bedingte Herz-Kreislaferkrankungen werden jährlich hohe Kosten verursacht, die vom Gesundheitssystem getragen werden müssen. Nach Angaben des statistischen Bundesamtes entfielen 2008 in Deutschland fast 20% der Gesamtausgaben auf Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems.

2.2 Pathogenese der Atherosklerose

Man geht heute davon aus, dass die pathophysiologischen Ereignisse, die zur Entstehung atherosklerotischer Läsionen führen mit einer Schädigung des Gefäßendothels beginnen [2]. Als Ursache für die Endothelschädigung werden Faktoren wie Dyslipoproteinämie, Hypertonie, eine diabetische Stoffwechsellage oder Noxen (z.B. Zigarettenrauchen) angenommen. Diese Faktoren stellen gleichzeitig auch die wesentlichen durch epidemiologische Untersuchungen belegten Risikofaktoren der Atherosklerose dar [4,5]. Durch die Endothelschädigung kommt es zur Induktion von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, die zu einem verstärkten Einwandern weißer Blutzellen in den subendothelialen Raum beitragen. Zu den Adhäsionsmolekülen gehören z.B. VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin und P-Selektin [3]. Parallel kommt es durch Störung der Barrierefunktion des Endothels zur Einlagerung von Lipoproteinen, v.a. Low-Density-Lipoprotein (LDL) in die Intima der Gefäßwand. Dies geschieht konzentrationsabhängig durch Diffusion. In der

Gefäßwand kommt es dann zu einer Oxidation der LDL-Partikel [6]. Dieser für die Atherogenität der Lipoproteine entscheidende Prozess ist noch nicht abschließend geklärt. Neben Autooxidationsprozessen werden verschiedene Enzyme als mögliche Verursacher beschrieben. Zum Beispiel werden der Myeloperoxidase, der 15-Lipoxygenase und der induzierbaren Nitric Oxide Synthase eine wesentliche Rolle bei der Oxidation von LDL-Molekülen zugesprochen [7]. Es wird angenommen, dass durch diese Enzyme freie Radikale entstehen, welche zur LDL-Oxidation führen. Durch die Oxidation der LDL-Partikel wird die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit das Einwandern von Lymphozyten und Monozyten aus der Blutstrombahn in die Intima verstärkt. Auch die Rolle des Immunsystems rückt in der Pathogenese der Atherosklerose immer deutlicher in den Vordergrund [8,9]. Viele Faktoren, welche im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen gesehen wurden konnten auch in der Atherogenese nachgewiesen werden. Neben Zellen der angeborenen Immunantwort (z.B. Monozyten, Makrophagen) spielen auch Zellen der adaptiven Immunantwort (T-Lymphozyten) eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Hierbei werden Th1-Lymphozyten und Th2-Lymphozyten unterschieden. Für die Th1 Immunantwort charakteristisch sind vor allem das von Th1-Helferzellen produzierte Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-12 (IL-12) sowie das Interferon- γ (IFN- γ) und der Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α). Interferon- γ ist das charakteristische Zytokin für diese Immunantwort [7]. Es wurde in humanen Plaques nachgewiesen und führt zur Reduktion der Kollagenfaserbildung, einer höheren Expression des Major Histocompatibility Class II (MHC II) Komplexes, einer erhöhten Sekretion von Proteasen und Chemokinen, zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und zur Aktivierung von Endothelzellen und Makrophagen [10]. Dies wurde auch in Tierexperimenten bestätigt. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse bei denen INF- γ oder der IFN- γ Rezeptor nicht vorhanden ist kleinere atherosklerotische Läsionen ausbilden [11,12].

Dazu im Gegensatz stehen von Th2-Helferzellen produzierte Mediatoren wie das Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5), Interleukin-10 (IL-10) und das Interleukin-13 (IL-13), welche zur Antikörperbildung und zur Hemmung von Makrophagen führen [13]. Die Rolle der Th-2 Immunantwort bezüglich der Atherosklerose ist nicht sicher geklärt. Es gibt sowohl Arbeiten, welche eine proatherogene Komponente beschreiben [14], als auch Arbeiten, bei denen eher ein protektiver Effekt [15] oder kein Effekt [15,16] beschrieben wurden.

Im subendothelialen Raum kommt es schließlich zur Aufnahme modifizierter LDL-Partikel durch Makrophagen. An der intensiven Aufnahme dieser Partikel sind vor allem Scavenger-Rezeptoren wie SR-A und CD-36 beteiligt [3]. Nur über diese Rezeptoren können größere Mengen LDL-Cholesterin in die Makrophagen gelangen, da diese nicht konzentrationsabhängig reguliert werden [17]. Die ungebremschte Aufnahme cholesterinreicher Lipoproteine kann schließlich zur Ausbildung von Makrophagen-Schaumzellen führen [6]. Bei weiterer Progression kann es nachfolgend zur Apoptose und Nekrose der so entstandenen Schaumzellen und zur Bildung eines lipidreichen, nekrotischen Kerns der atherosklerotischen Plaques kommen [18]. Häufig kommt es auch zur Einwanderung von glatten Muskelzellen und Bindegewebe, so dass sich eine sogenannte fibröse Kappe bildet [9]. Das Konzept der Plaque Stabilität besagt, dass eine ausreichend dicke fibröse Kappe klinisch günstig ist und vor dem Einbrechen des darunterliegenden atheromatösen Materials in die Blutstrombahn schützt. Demgegenüber wird eine dünne fibröse Kappe als klinisch ungünstig gesehen und prädisponiert zur Plaque Ruptur [19]. Dabei gewinnt der atheromatöse Kern der Plaques Kontakt mit der Blutstrombahn und führt über die Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Ausbildung eines Thrombus. Im schlimmsten Fall führt dies zum kompletten Verschluss der Gefäßlumens, was zur Minderperfusion des nachgeschalteten Organs und damit zum Untergang von Gewebe führt [6]. Therapeutische Konzepte zielen daher auf die Plaque-Stabilisierung zum Schutz vor Plaque Ruptur ab.

2.3 Umweltbedingte und genetische Einflüsse auf die Atherosklerose

Aus Heritabilitätsuntersuchungen ist bekannt, dass der genetische Anteil am Risiko atherosklerotischer Gefäßerkrankungen etwa 50% beträgt. Den Rest machen Umwelteinflüsse aus [20]. Zu den umweltbedingten Faktoren welche die Atheroskleroseausprägung beeinflussen gehören beispielsweise der Nikotinkonsum, die Ernährung, Bewegungsmangel und Luftverschmutzung [21]. Die gleichzeitige Wirkung genetischer und umweltbedingter Einflüsse trifft nicht nur für die Ausprägung der Atherosklerose selbst zu, sondern auch für die wesentlichen endogenen Risikofaktoren, wie erhöhte LDL und erniedrigte HDL-Plasmakonzentrationen, Hypertonie und Diabetes mellitus. All diese Faktoren sind zu einem hohen Grad genetisch determiniert [22] aber unterliegen gleichzeitig selbst auch umweltbedingten Einflüssen.

Die Atheroskleroseanfälligkeit selbst ist ein komplexes genetisches Merkmal. Es liegt dementsprechend nicht ein einzelnes Gen zu Grunde, welches die Ausprägung reguliert, vielmehr sind Varianten in zahlreichen Genen involviert. Dies macht es schwierig einzelne Gene zu identifizieren, welche ursächlich sind.

Für die hypothesenfreie Identifizierung genetischer Faktoren bieten sich Kopplungsuntersuchungen, englisch Quantitative Trait Locus (QTL) Mapping und genomweite Assoziationsstudien an. Diese sind beim Menschen und in experimentellen Kreuzungen von Tiermodellen durchgeführt worden. Eine Kopplungsuntersuchung in einer F2 Generation von Mäusen unterschiedlicher Atherosklerosedisposition war Inhalt der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden detailliert behandelt [23]. Parallel dazu sind in den letzten Jahren durch Verbesserungen der Genotypisierungstechnik, die mittels Arrays die gleichzeitige Typisierung einer großen Zahl (>500.000) von Genvarianten pro Individuum erlaubt, große Erfolge bei der Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose in genomweiten Assoziationsstudien erzielt worden. Assoziationsstudien unterscheiden sich von Kopplungsuntersuchungen durch die Verwendung nicht verwandter Individuen. Aktuell sind beim Menschen rund 50 Genorte bekannt [24] welche mit der Atherosklerose assoziiert sind. In genomweiten Studien wurden immer neue Loci identifiziert, was vor allem durch eine Erhöhung der Fallzahl erreicht werden konnte. So wurden zuletzt in einer Metaanalyse genomweiter Assoziationsstudien mit über 20000 Patienten und über 60000 Kontrollen 13 neue Genloci der koronaren Herzerkrankung beschrieben [25]. Erstaunlicherweise ist der Großteil der identifizierten Genloci völlig unabhängig von bekannten Kandidatengenen, die sich aus dem derzeitigen Verständnis der Pathophysiologie der Atherosklerose ableiten. Dies deutet darauf hin, dass die Gesamtheit der Entstehung dieser häufigen Erkrankung heute erst in Ansätzen verstanden ist [26].

2.4 Identifizierung von Genen der Atherosklerosedisposition im Mausmodell

2.4.1 Mausmodelle der Atherosklerosedisposition

Mäuse entwickeln unter natürlichen Bedingungen keine Atherosklerose. Um trotzdem atherosklerotische Läsionen zu induzieren wurden zunächst fett- und cholesterinreiche Diätzusätze verwendet [27]. Die auf diese Art induzierten Läsionen sind allerdings sehr klein und quantitative Unterschiede schwer messbar. Durch die

Entwicklung von Knock-out Mausmodellen, bei denen spezifische Gene des Lipidstoffwechsel deletiert wurden ist es gelungen Tiere mit einer hohen Atherosklerosedisposition herzustellen. Hierfür haben sich vor allem Apolipoprotein E (*Apoe*^{-/-}) und LDL-Rezeptor defiziente (*Ldlr*^{-/-}) Mäuse bewährt. Bei *Apoe*^{-/-} Mäusen ist vor allem die Aufnahme von Cholesterin-transportierenden Remnant-Lipoproteinen durch die Leber gestört [28,29]. Diese Remnants gelten als besonders atherogen und kumulieren im Blutplasma. *Apoe*^{-/-} Mäuse entwickeln daher auf einer Haltungsdiät bereits im Alter von wenigen Wochen massive atherosklerotische Läsionen. *Ldlr*^{-/-} Mäuse sind demgegenüber durch eine Hypercholesterinämie charakterisiert, welche durch die fehlende LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Leber entsteht [30]. Außer den im Vergleich zu den diät-induzierten Modellen signifikant größeren Läsionen zeigen die Läsionen der Knock-out Modelle auch eher die Charakteristika der humanen Atherosklerose [31]. Weiterhin ist die Größe der atherosklerotischen Läsionen wesentlich abhängig vom genetischen Hintergrund der Tiere. So sind bei dem Referenzmausstamm C57BL/6 (B6) große atherosklerotische Läsionen messbar wenn die Tiere mit einer entsprechenden Diät gefüttert werden [32]. Im Gegensatz dazu konnte für den ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendeten BALB/c Mausstamm gezeigt werden, dass dieser eher Atherosklerose resistent ist [33]. Unterschiede der Atherosklerosedisposition bei Inzuchtmausstämmen wurden zuerst Ende der 80er und Anfang der 90er Jahre mit Hilfe einer Diätinduktion der Atherosklerose gezeigt. Für die Stämme B6 und BALB/c konnten diese in der vorliegenden Arbeit auf dem *Ldlr*^{-/-} Hintergrund bestätigt werden und boten so eine robuste Grundlage für die beschriebenen Kopplungsuntersuchungen zwischen den beiden Stämmen [23].

Ein weiteres, genetisch determiniertes Merkmal bei verschiedenen Mausstämmen sind Unterschiede in der vorherrschenden Immunantwort. Wie oben beschrieben gibt es mindestens zwei verschiedene Formen der erworbenen Immunantwort, welche weitgehend durch die Polarisierung von T-Helferzellen in Th1 bzw. Th2 Zellen und die damit verbundene charakteristische Zytokinproduktion bestimmt sind. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausstämmen BALB/c und B6 weisen eben diesen Unterschied in der Immunantwort auf. So wird beschrieben, dass bei B6 Mäusen eine Th1-Immunantwort vorherrscht wohingegen bei BALB/c Mäuse eine Th2 Antwort dominiert [34]. Es wurde außerdem gezeigt, dass es zu unterschiedlicher Ausprägung der Atherosklerose kommt, je nachdem, welche Immunantwort vorherrscht [35].

In der Atheroskleroseforschung werden Mausmodelle für zwei Hauptfragestellungen eingesetzt: Zum einen zur hypothesenorientierten funktionellen Untersuchungen von Kandidatengenen der Atherosklerose und zum anderen zur hypothesenfreien Identifizierung neuer Genorte der Atherosklerosedisposition mit Hilfe von Kopplungsuntersuchungen (QTL Mapping). Auf diese Aspekte soll in den Folgenden beiden Kapiteln eingegangen werden.

2.4.1.1 Untersuchung von Kandidatengenen der Atherosklerose im Mausmodell

Kandidatengene der Atherosklerose ergeben sich aus der bekannten Pathophysiologie der Erkrankung oder weil sie an Genorten liegen, die in genetischen Ansätzen mit der Atherosklerosedisposition in Verbindung gebracht worden sind. Kandidatengenuntersuchungen haben das Ziel, die Funktion eines bekannten Genes bezüglich der Atherosklerose zu untersuchen. Hierfür gibt es zwei wesentliche Möglichkeiten. Zum einen kann ein interessierendes Gen aus dem Genom „entfernt“ werden. Dies entspricht dem „knock-out“ Modell. Der komplementäre Ansatz ist die Herstellung eines transgenen Organismus, bei dem ein Kandidatengen gezielt überexprimiert wird. Der Einfluss des ausgeschalteten bzw. des überexprimierten Genes auf die Atherosklerose kann somit spezifisch untersucht werden und kann auf diese Weise Erkenntnisse über Pathomechanismen der Atherosklerose liefern [24]. Ein Beispiel ist der Nachweis der Rolle der Lipoxxygenase in der Pathogenese der Atherosklerose. So konnte gezeigt werden, dass in Lipoxxygenase-defizienten Mäusen wesentlich kleinere Läsionen auftreten als in Wildtyp Tieren [36]. Bestätigen ließen sich diese Ergebnisse in einem Ansatz mit transgenen Tieren. Es wurden Mäuse generiert, welche eine Überexpression von Lipoxxygenase zeigten. In diesen Tieren kam es zu signifikant größeren atherosklerotischen Läsionen als bei den Kontrolltieren, welche das Transgen nicht trugen [37].

2.4.1.2 Hypothesenfreie Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose im Mausmodell

Unterschiede der Atherosklerosedisposition von Mausstämmen können für explorative Ansätze verwendet werden mit dem Ziel neue Gene bzw. Genloci zu identifizieren, die für die Unterschiede der Atheroskleroseanfälligkeit verantwortlich sind. Genloci (engl. Quantitative Trait Loci; QTL) sind Abschnitte im Erbgut, für

welche in genetischen Kreuzungen ein wahrscheinlicher Zusammenhang mit dem Atherosklerose-Phänotyp nachgewiesen wurde. Theoretisch kann ein Genlocus entweder nur von einem Gen beeinflusst sein oder auch mehrere Gene als Grundlage haben. Arbeitsschritte für die Genidentifizierung bei komplexen Erbgängen wurden als ein Prozess mit mehreren Stufen beschrieben [38]. Ein erster Schritt besteht darin signifikante Kopplungen für interessierende Genorte nachzuweisen, dass heißt mögliche Zusammenhänge zwischen dem untersuchten Phänotyp und einem oder mehreren Genorten zu identifizieren. Dies kann beispielsweise durch genomweite Kopplungsuntersuchungen (QTL Mapping) bei Inzuchtmausstämmen erfolgen und wurde in der vorliegenden Arbeit als Methode der Wahl verwendet. Als Voraussetzung für QTL Mapping muss eine Population miteinander verwandter Individuen mit unterschiedlicher Ausprägung des Atherosklerosephänotyps vorliegen. In diesen Individuen wird schließlich durch genomweite Analyse geprüft, ob es Genloci gibt, die überdurchschnittlich häufig mit dem Ausmaß der Atherosklerose segregieren. Dies soll anhand des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kreuzungsexperiments von B6 und BALB/c Mäusen exemplarisch dargestellt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 376 Tiere einer F2 Generation zwischen den beiden Parentalstämmen (B6 und BALB/c) generiert. Dabei wurden B6 und BALB/c Mäuse zunächst miteinander verpaart und eine F1 Generation hergestellt. Tiere der F1 Generation erhalten jeweils ein mütterliches und ein väterliches Chromosom (oder Allel) und weisen somit eine genomweite Heterozygotie für B6 und BALB/c auf. Aus dieser F1 Generation wurde dann durch Geschwisterverpaarung eine F2 Generation gezüchtet (Siehe Abb. 1), bei der es zu einer zufälligen Rekombination des genetischen Materials kommt.

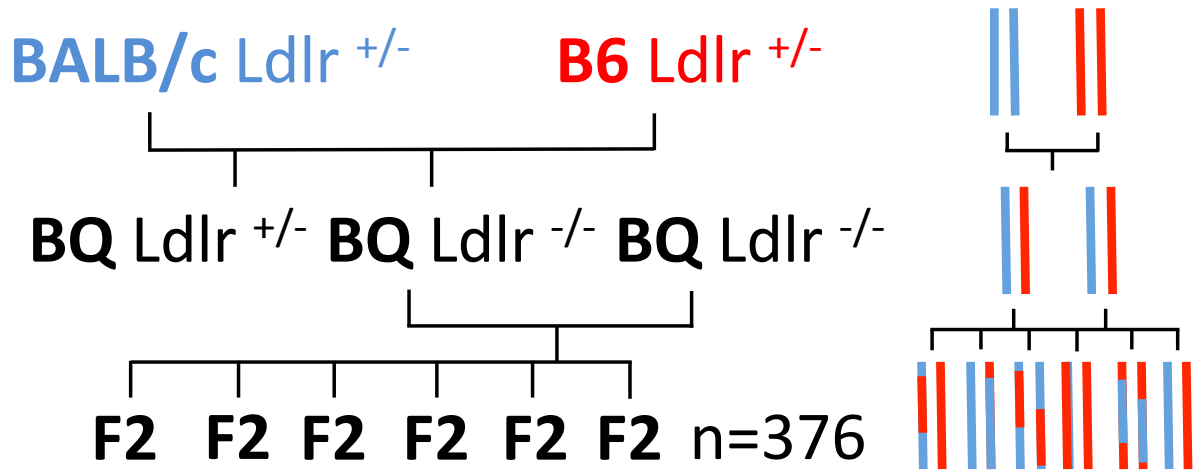


Abb.1: Verpaarungsschema zur Generierung von F2 Tieren im Rahmen der vorliegenden Arbeit. BQ: Tiere der F1 Generation aus BALB/c und B6. Ldlr: Low-density lipoprotein receptor, +/-: heterozygot; -/-: homozygot: Die Balken auf der rechten Seite stellen schematisch das komplette Maus-Genom dar (blau: BALB/c; rot: B6).

Die entstandenen Tiere der F2-Generation wurden dann genotypisiert und phänotypisiert, d.h. die Ausprägung der Untersuchungsmerkmale („Traits“) quantitativ erfasst [32].

Die Genotypisierung erfolgte mittels genetischer Marker, welche über das gesamte Genom verteilt sind und bekannte Unterschiede (Polymorphismen) zwischen den beiden Mausstämmen aufweisen. Hierfür werden klassischerweise Mikrosatellitenmarker verwendet, außerdem sind Einzelnukleotid-Polymorphismen (Singlenucleotide Polymorphisms; SNPs), die zwischen den beiden Stämmen unterscheiden gut geeignet. Anhand dieser Daten erfolgte dann die initiale Kopplungsanalyse [39,40]. Zur weiteren Eingrenzung der resultierenden QTLs wurde ein Finemapping durchgeführt. Hierzu wurde der Genombereich des QTL durch weitere Marker untersucht und damit das Intervall, welches zwischen zwei Markern liegt eingengt. Somit lässt sich die Größe des QTLs und somit die Zahl der im QTL Intervall liegenden Gene reduzieren, was die Identifizierung des dem QTL zugrundeliegendem kausalen Gen erleichtert [32]. Liegen keine weiteren Marker mehr in dem zu untersuchenden Genom stehen weitere Methoden zur Intervalleinengung zur Verfügung. Eine Möglichkeit ist es eine Haplotypanalyse

durchzuführen. Hierfür hat sich die Verwendung des Mouse Haplotype Block Viewer bewährt um die Abschnitte zu identifiziert, welche keine durch Abstammung erworbene Gleichheit („non identical-by-descent“ (non-IBD)) zwischen verschiedenen Mausstämmen aufweisen. In Regionen in denen die beiden Mausstämme Allele vom gleichen Vorfahren aufweisen ist es unwahrscheinlich das zu Grunde liegende Gen eines QTLs zu identifizieren [41]. Ein weiterer Ansatz ist der Ansatz des Genomvergleichs [42]. Bei diesem Ansatz wird angenommen, dass das Gen welches einem QTL zu Grunde liegt in humanem- und Mausgenom identisch ist, wenn der QTL sich in syntenen Regionen befindet. Mittels Mouse Map Converter ist es möglich die Überlappungen der syntenen Regionen zu identifizieren und dadurch das Intervall zu reduzieren.

Erschwerend bei komplexen genetischen Merkmalen ist, dass im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen, bei denen ein einzelnes Gen ursächlich für die Ausbildung des pathologischen Phänotyps in Form der Erkrankung ist, kein eins-zu-eins Verhältnis zwischen Genotyp und Phänotyp besteht [43]. Eine einzelne Mutation in einem einzelnen Gen führt also nicht zwangsläufig zu einer Veränderung im Phänotyp. Diese können erst bei Untersuchung entsprechend großer Fallzahlen beobachtet werden.

In neuerer Zeit haben Expressionsanalysen ein hohes Potential gezeigt, um Kandidatengenen an Genloci näher zu untersuchen. Hierzu wird die Expression von Einzelgenen oder des kompletten Transkriptoms mittels Genexpressionsarrays quantifiziert. mRNA Transkriptkopien werden dann als quantitatives Merkmal betrachtet und als Expressions-QTLs (eQTLs) kartiert. Kommt es zur Co-Segregation mit chromosomalen Regionen die ein komplexes Merkmal wie zum Beispiel die Atherosklerose kontrollieren, lässt dies Rückschlüsse auf das zugrundeliegende Gen zu und erleichtert somit die Genidentifikation. Einige kausale Gene wurden auf diese Weise an genetischen Loci identifiziert [44,45].

Zusammenfassend werden Mausmodellen komplementär zu humanen Studien zur Identifikation genetischer Faktoren der Atherosklerosedisposition eingesetzt. Da es wahrscheinlich ist, dass die gleichen Gene für konkordante Genloci bei Menschen und Mäusen verantwortlich sind könnte die Identifikation von Atherosklerose modifizierenden Genen im Mausmodell neue Erkenntnisse bringen, die auch für die pathologischen Veränderungen beim Menschen verantwortlich sind.

2.5 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Die individuelle Disposition für atherosklerotisch bedingte Gefäßerkrankungen ist ein komplexes genetisches Merkmal. In aktuellen genomweiten Untersuchungen beim Menschen und in Tiermodellen werden aktuell immer neue Genorte der Atherosklerosedisposition identifiziert, die darauf hindeuten, dass das volle Ausmaß der genetischen Komponente der Atherosklerose heute erst in Ansätzen bekannt ist. Hypothese der vorliegenden Arbeit war es, dass es durch Kopplungsanalyse (QTL Mapping) in einer Kreuzung von atheroskleroseempfindlichen B6.*Ldlr*^{-/-} und atheroskleroseresistenten BALB/c.*Ldlr*^{-/-} Mäusen neue Genloci zu identifizieren, die für die unterschiedliche Atherosklerosedisposition der beiden Stämme verantwortlich sein könnten.

Diese beiden Mausstämme wurden bisher nicht für QTL-Studien verwendet. Neben der unterschiedlichen Atherosklerosedisposition war auch die unterschiedlich vorherrschende Immunantwort ausschlaggebend für die Auswahl. Wie eingangs beschrieben, zählt B6 zu den Mausstämmen bei denen die Th1 Immunantwort vorherrschend ist. BALB/c wird im Gegensatz dazu zu den Th2 Stämmen gezählt. Um weiter Hinweise zur Identifikation zu Grunde liegender Gene zu erhalten wurden außer der Atherosklerose auch Atherosklerose modifizierende Faktoren untersucht. Dies ist ein neuer Ansatz, der bisher in diesem Maß nicht durchgeführt wurde. Für jedes Chromosom entsteht so eine QTL-Karte für alle Phänotypen die bezüglich der Co-Segregation von Phänotypen am gleichen Genort untersucht werden kann. Somit könnte die Identifikation von zugrundeliegenden Genen vereinfacht und der komplette Prozess des QTL-Mappings und der Genidentifikation verkürzt werden. Ziel der Arbeit war somit die Identifizierung neuer Genorte der Atherosklerosedisposition und Atherosklerose modifizierender Faktoren durch QTL-Mapping in BALB/c.*Ldlr*^{-/-} und B6.*Ldlr*^{-/-} Mäusen.

3 Zusammenfassung

Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med.

Kopplungsuntersuchung zur Identifizierung Atherosklerose assoziierter Genorte und Atherosklerose modifizierender Faktoren in LDL-Rezeptor defizienten BALB/c und C57BL/6 Mäusen

Eingereicht von:

Simon Sündermann, geb.: 20.11.1979

Angefertigt am:

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Leipzig

Betreut von Prof. Dr. med. Daniel Teupser und Prof. Dr. med. Joachim Thiery

Eingereicht 12/2011

Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue Genorte (Loci) der Atherosklerosedisposition und Atherosklerose modifizierender Faktoren im Mausmodell zu identifizieren.

Dazu wurde zum ersten Mal eine Kreuzung aus C57BL/6 (B6) Mäusen und BALB/cByJ (BALB/c) Mäusen auf dem LDL-Rezeptor defizienten (*Ldlr*^{-/-}) Hintergrund verwendet. B6. *Ldlr*^{-/-} Mäuse wurden von Jackson Laboratory erworben BALB/c.*Ldlr*^{-/-} Mäuse wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Marker Assisted Backcrossing gezüchtet [46]. Nachdem diese Tiere generiert waren wurde das eigentliche Kreuzungsregime auf zwei Arten durchgeführt. Zum Einen wurden männliche BALB/c Tiere mit weiblichen B6 Tieren zu einer heterozygoten F1 Generation verpaart und die F2 Generation anschließend durch Inzuchtverpaarungen der F1 erzeugt. Hierdurch entstanden 95 männliche und 95 weibliche Nachkommen. Im zweiten Fall wurden weibliche BALB/c Tiere mit männlichen B6 Tieren zu einer heterozygoten F1 Generation verpaart und anschließend die F2 Generation durch Inzuchtverpaarungen der F1 erzeugt. Hierdurch entstanden 94 männliche und 92 weibliche Nachkommen. Diese sogenannte reziproke Verpaarung wurde verwendet, da in Vorarbeiten gezeigt wurde, dass der Ursprung des Y-Chromosoms Auswirkung auf die Ausprägung von Atherosklerose QTLs hat [32]. Alle Tiere der F2 Generation wurden nach 28 Tagen abgesetzt und mit einer standardisierten semisynthetischen

Diät ernährt, welche 0.02% Cholesterol enthielt. Nach 16 Wochen Fütterung wurden die Tiere getötet und seziert.

Hierzu wurden die Tiere zunächst durch intraperitoneale Narkose anästhesiert. Danach wurde der Thorax eröffnet und eine Exsanguination über die Herzspitze durchgeführt. Das Herz sowie der Truncus brachiocephalicus wurden entnommen und in Tissue-Tek OCT konserviert. Weitere Organe wie Leber und Niere, Dick- und Dünndarm sowie Fettgewebe von unterschiedlichen Lokalisationen wurden entnommen. Aus dem entnommenen Blut wurden verschiedene Parameter der klinischen Chemie gemessen sowie die Plasma-Lipoproteinfraktionen gewonnen. Plasmazytokinkonzentrationen wurden mittels eines Multiplex Zytokin-Immunoassays bestimmt.

Die Atheroskleroseausprägung wurde aus Gefrierschnitten im Bereich der Aortenwurzel bestimmt. Die Gefrierschnitte wurden mit Öl-rot O gefärbt, fotografiert und die Größe der atherosklerotischen Läsionen manuell unter dem Mikroskop ausgemessen („*Materials and Methods*“ und Tabelle 1 im Manuskript). Insgesamt wurden so außer der Atherosklerose 61 weitere Phänotypen bestimmt, welche einen potentiellen Zusammenhang mit der Atheroskleroseausprägung aufweisen. Diese hohe Anzahl an parallel bestimmten Phänotypen zur Identifikation von Co-Segregation war in vorhergehenden Arbeiten bisher nicht verwendet worden und sollte die Chance erhöhen zu Grunde liegende Gene zu identifizieren. Von allen Tieren wurde DNA aus einer Schwanzbiopsie gewonnen. Eine initiale Genotypisierung des gesamten Genoms jedes Tieres wurde mittels eines Sets Mikrosattelitenmarkern, welche Polymorphismen zwischen beiden Mausstämmen aufweisen durchgeführt. Es wurden 107 solcher Marker mit einem Abstand von ca. 15 cM verwendet. Um eine feinere Kartierung identifizierter Loci zu erhalten wurde im Anschluss ein Finemapping mittels Singlenucleotide Polymorphismen und Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. („*Supplemental Table II*“ im Manuskript).

Nachdem wie oben beschrieben alle Phänotypen und Genotypen bestimmt worden waren, wurde die Kopplungsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde die Software „MapManager QTX, version b20 [40] verwendet. Durch diese Analyse wurden Logarithm of odds (LOD-Scores) errechnet. Die Höhe der Signifikanzniveaus wurde durch Permutationstest bestimmt. Zur Identifizierung möglicher kausaler Gene wurden verschieden Ansätze verwendet. Zunächst erfolgte aus der Datenbank der Mouse Genome Informatics Datenbank der Jackson Laboratories (www.informatics.jax.org) eine Aufstellung der Gene, welche im interessierendem

Abschnitt des Mausgenoms liegen. Zur weiteren Reduktion der Intervallbreite erfolgte eine Haplotypanalyse sowie eine vergleichende Genomanalyse der entsprechenden syntenen Region des humanen Genoms (siehe 2.4.1.2).

Ergebnisse:

Wie in Voruntersuchungen mit diätinduzierter Atherosklerose in BALB/c.*ApoE*^{-/-} Mäusen zeigten auch die durch unser Kreuzungsregime erzeugten BALB/c.*Ldlr*^{-/-} Mäuse eine ausgeprägte Atheroskleroseresistenz. Die Läsionen waren signifikant kleiner als bei B6 Tieren. Außerdem konnten signifikante Unterschiede im Lipidprofil der beiden Mausstämme gezeigt werden. Die Unterschiede im Zytokinmuster waren vernachlässigbar entgegen der Hypothese, dass sich die beiden Mausstämme in ihrer Immunantwort unterscheiden.

Durch die Kopplungsanalyse konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals ein neuer Atherosklerose-QTL auf dem proximalen Chromosom 2 des Mausgenoms identifizieren werden, welcher entsprechend der vorhergehenden Klassifizierung von Atherosklerose-QTLs „Ath39“ genannt wurde. Der Locus lies sich bei beiden Geschlechtern nachweisen. Bei den männlichen Mäusen zeigte sich ein LOD-Score von 6.2 ($p < 0.001$). Der LOD-Score bei weiblichen Mäusen betrug ebenfalls 6.2 ($p < 0.001$). (Figure 1 im Manuskript). Um das Intervall zwischen den beiden initial eingesetzten Markern zu verkleinern wurden 3 weitere SNP-Marker auf diesem Genabschnitt eingesetzt. Die höchsten LOD-Scores zeigten sich bei den männlichen Mäusen im Bereich des Markers D2mit7 (Position 38.1 Mb) und bei den weiblichen Mäusen im Bereich rs27192030 (SNP-Marker, Position 34.4 Mb). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das B6 Allel am Marker D2mit7 mit signifikant größeren atherosklerotischen Läsionen assoziiert ist (Figure 1 des Manuskriptes).

Wie oben beschrieben wurde die Kreuzung nach einem reziproken Modell durchgeführt. Daher stammten 190 Nachkommen aus der Kreuzung von männlichen B6 Tieren mit weiblichen BALB/c Tieren und 186 Nachkommen aus der umgekehrten Kreuzung. Die in Vorarbeiten beschriebene Linienabhängigkeit (siehe oben) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Läsionsgröße an dem QTL auf Chromosom 2.

Außer dem Atherosklerose QTL konnten eine Koloalisation eines signifikanten QTL für VLDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin auf Chromosom 2 gezeigt werden (Figure 2 im Manuskript). Da der Vererbungsmodus für die Größe der atherosklerotischen Läsionen und das Lipidprofil ähnlich sind, besteht die Möglichkeit, dass die genetischen Faktoren, welche zur Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen

beitragen vor allem durch die Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel entstehen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Korrelationen zwischen der Atherosklerose und diesen Merkmalen berechnet. Tatsächlich zeigten sich die höchsten Korrelationen zwischen der Größe der atherosklerotischen Läsionen und der Konzentration an LDL-Cholesterin und VLDL-Cholesterin (Figure 5 im Manuskript).

Potentielle Kandidatengene:

Der neu beschriebene QTL erstreckt sich auf Chromosom 2 zwischen den Positionen 30 und 38 cM. Dieser Abschnitt enthält 219 Gene. Zur Reduktion der Breite wurde zunächst eine Haplotypanalyse durchgeführt. Der Locus befindet sich in einem Gebiet welches „identical by descent“ (IBD) zwischen B6 und BALB/c ist. Dies ist ein interessantes Ergebniss, da IBD Regionen für Kopplungsanalysen normalerweise nicht berücksichtigt werden, da angenommen wird, dass die Wahrscheinlichkeit in diesen gemeinsamen konservierten Regionen die zu Grunde liegende Variante zu identifizieren sehr gering ist. Die Lage des Locus in einer IBD Region könnte ein Hinweis darauf sein, dass die kausale Mutation die dem Locus zu Grunde liegt eine de novo Mutation ist, die erst nach der Separation der Stämme entstanden ist.

Durch eine vergleichende Genomanalyse mit „Mouse Map Converter“ konnte auch ein Überlappen der syntenen Regionen auf einer Region von 12.3 Mb identifiziert und damit das Intervall auf diese Größe reduziert werden. In diesem Abschnitt befinden sich nur noch 63 Gene von denen 19 bekanntermaßen keinen Zusammenhang mit der Atherosklerose zeigen. Somit konnten wir die Anzahl an potentiellen Kandidatengenen auf 44 reduzieren (Supplemental Table V). Zwei dieser Gene spielen potentiell eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose, nämlich *Pla2rl*, welches einen Rezeptor der sekretorischen Phospholipase kodiert [47]. Außerdem *Nr4a2*, welches den Orphan Kernrezeptor NURR1 kodiert. NURR1 wurde in zahlreichen Studien beim Menschen und im Mausmodell im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose beschrieben [48]. Aufgrund der Vermutung, dass es sich bei beiden Genen um Kandidaten für Unterschiede der Atherosklerosedisposition handelt wurden Expressionsanalysen aus Lebergewebe durchgeführt. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expression beider Gene in F2 Mäusen nachgewiesen werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass eine Genvariante, welche die Expression diese beiden Gene beeinflusst die dem QTL zu Grunde liegenden Gene sind.

Diskussion:

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal ein Locus für die Größe atherosklerotischer Läsionen auf dem proximalen Abschnitt von Chromosom 2 des Mausgenoms von *Ldlr*^{-/-} BALB/c Mäusen identifiziert werden. Zudem zeigte sich eine Co-Segregation des Atheroskleroselokus mit Loci für HDL und VLDL-Cholesterin. Während für das HDL und weitere metabolische Parameter bereits in früheren Untersuchungen QTL in überlappenden Bereichen auf Chr2 beschrieben wurden [49], gab es bislang keine Hinweise für einen Atheroskleroselokus in diesem Chromosomenabschnitt.

Eine Kolokalisation zeigte sich für very-low density lipoprotein (VLDL) Cholesterin. Ein Zusammenhang zwischen VLDL-Cholesterin und Atherosklerose ist in Mausexperimenten gezeigt worden. Es wurde beschrieben dass VLDL-Cholesterin sogar der stärkste Prädiktor für die Atheroskleroseausbildung in der Aortenwurzel bei *Ldlr*^{-/-} Mäusen ist [50].

Eine weitere Kopplung zeigte sich in unseren Experimenten auch bezogen auf die Fettmasse. Dies und der Zusammenhang zwischen Körperfettmasse und erhöhten VLDL-Cholesterin Plasmakonzentrationen ist beschrieben [51]. Grundlage des identifizierten Locus könnte somit zum einen ein Gen sein, welches ein Protein kodiert, dass am Anfang einer Kausalitätskette steht oder aber mehrere Gene welche innerhalb des Locus liegen und für verschiedene Proteine mit verschiedenen Wirkmechanismen kodieren.

Die Kopplungsanalyse war somit der erster Schritt zur Identifikation von Genen im Zusammenhang mit der Atheroskleroseausprägung. Durch das QTL-Mapping, das Finemapping und vergleichende Analysen mit dem humanen Genom ist es gelungen ein Genomabschnitt zu identifizieren, der eine signifikante Assoziation mit der Atherosklerose aufwies und diesen auf einen bestimmten Bereich einzugrenzen. Dies führte zur Identifizierung von *Nurr1* und *Pla2r1* als Kandidatengene.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Expressionsuntersuchungen der beiden Gene durchgeführt um eQTLs zu identifizieren. Die Unterschiede in der Expression der Gene war in der Parenteral- und der F2-Generation zwar nicht signifikant und die Expressionsunterschiede in diesen beiden Genen somit nicht verantwortlich für den Locus. Jedoch werden zum Beispiel Mutationen, die zu Aminosäureaustausch führen und damit zu funktionellen Proteinveränderungen hierdurch nicht erfasst und könnten ursächlich sein.

Neben dem Lipidstoffwechsel wird auch dem Immunsystem eine große Rolle bei der

Entstehung der Atherosklerose zugeschrieben. Vor allem die Zytokine der TH-1 Immunantwort wurden als atherogen beschrieben. Bei den von uns durchgeführten Experimenten konnten jedoch keine QTLs für Zytokinplasmakonzentrationen nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass trotzdem ein Zusammenhang besteht, da die im Plasma gemessenen Zytokinwerte sich von dem Zytokinmilieu im Endothel der Gefäßwand unterscheiden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch diese Studie ein neuer QTL („Ath39“) für Atherosklerose und weitere Phänotypen des Lipidstoffwechsels, insbesondere VLDL- und HDL-Cholesterin auf dem proximalen Abschnitt des Chromosoms 2 identifiziert werden konnte. Diese Ergebnisse werden auch von Kopplungsanalysen in humanen Studien gestützt, die in den syntenen Regionen im humanem Genom QTLs für Atherosklerose und HDL-, VLDL- und LDL-Cholesterin identifiziert haben [52][53][54]. Erste funktionelle Untersuchungen zu Kandidatengenen in diesem Intervall wurden durchgeführt führten aber nicht zu einer abschliessenden Klärung. Die Identifikation kausaler Gene an identifizierten Loci ist auch aktuell noch eine Herausforderung [24] und wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Literaturverzeichnis

- 1 Mathers CD, Loncar D; Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *Plos Med.* 3(11), e442 (2006).
- 2 Crowther M Pathogenesis of atherosclerosis. Am Soc Hematol Educ Program. 2005:436-41(2005).
- 3 Falk E; Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology.* 47(8), C7–C12 (2006).
- 4 Assmann G, Cullen P, Schulte H; Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation.* 105(3), 310–315 (2002).
- 5 Cheng AY, Leiter LA; Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Current Opinion in Internal Medicine.* 5(5), 461–465 (2006).
- 6 Lusis AJ; Atherosclerosis. *Nature.* 407(6801), 233–241 (2000).
- 7 Glass CK, Witztum JL; Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 104(4), 503–516 (2001).
- 8 Hansson GK; Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 352(16), 1685–1695 (2005).
- 9 Hansson GK, Hermansson A; The immune system in atherosclerosis. *Nature Publishing Group.* 12(3), 204–212 (2011).
- 10 Hansson GK, Robertson AK, Söderberg-Nauclér C; Inflammation and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1(1), 297–329 (2006).
- 11 Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C; IFN- γ Potentiates Atherosclerosis in ApoE Knock-out Mice. *J Clin Invest.* 99(11), 2752-61 (1997).
- 12 Buono C, Come CE, Stavrakis G, Maguire GF, Connelly PW, Lichtman AH; Influence of Interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(3), 454–460 (2003).
- 13 Laurat E, Poirier B, Tupin E, Caligiuri G, Hansson GK, Bariéty J, Nicoletti A; In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 104(2), 197–202 (2001).
- 14 King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL

- receptor-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(3), 456–461 (2002).
- 15 Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP; T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation.* 103(21), 2610–2616 (2001).
 - 16 King VL, Cassis LA, Daugherty A; Interleukin-4 does not influence development of hypercholesterolemia or angiotensin II-induced atherosclerotic lesions in mice. *Am J Pathol.* 171(6), 2040–2047 (2007).
 - 17 Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL; Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest.* 105(8), 1095–1108 (2000).
 - 18 Geng YJ, Libby P; Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(9), 1370–1380 (2002).
 - 19 Carr S, Farb A, Pearce WH, Virmani R, Yao JS; Atherosclerotic plaque rupture in symptomatic carotid artery stenosis. *J. Vasc. Surg.* 23(5), 755–765; discussion 765–766 (1996).
 - 20 Wang X, Ishimori N, Korstanje R, Rollins J, Paigen B; Identifying novel genes for atherosclerosis through mouse-human comparative genetics. *Am J Hum Genet.* 77(1), 1–15 (2005).
 - 21 Brook RD; Cardiovascular effects of air pollution. *Clin Sci.* 115(6), 175 (2008).
 - 22 Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC; Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation.* 110(13), 1868–1873 (2004).
 - 23 Burkhardt R, Sündermann S, Ludwig D, Ceglarek U, Holdt LM, Thiery J, Teupser D; Cosegregation of Aortic Root Atherosclerosis and Intermediate Lipid Phenotypes on Chromosomes 2 and 8 in an Intercross of C57BL/6 and BALBc/ByJ Low-Density Lipoprotein Receptor-/- Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(4), 775–784 (2011).
 - 24 Chen Y, Rollins J, Paigen B, Wang X; Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. *Cell Metab.* 6(3), 164–179 (2007).
 - 25 Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AF, Barbalic M, Gieger C, Absher D, Aherrahrou Z, Allayee H, Altshuler D, Anand SS, Andersen K, Anderson JL, Ardisino D, Ball SG, Balmforth AJ, Barnes TA, Becker DM, Becker LC, Berger K, Bis JC, Boekholdt SM, Boerwinkle E, Braund PS, Brown MJ, Burnett MS, Buysschaert I; Cardiogenics, Carlquist JF, Chen L, Cichon S, Codd V, Davies RW, Dedoussis

- G, Dehghan A, Demissie S, Devaney JM, Diemert P, Do R, Doering A, Eifert S, Mokhtari NE, Ellis SG, Elosua R, Engert JC, Epstein SE, de Faire U, Fischer M, Folsom AR, Freyer J, Gigante B, Girelli D, Gretarsdottir S, Gudnason V, Gulcher JR, Halperin E, Hammond N, Hazen SL, Hofman A, Horne BD, Illig T, Iribarren C, Jones GT, Jukema JW, Kaiser MA, Kaplan LM, Kastelein JJ, Khaw KT, Knowles JW, Kolovou G, Kong A, Laaksonen R, Lambrechts D, Leander K, Lettre G, Li M, Lieb W, Loley C, Lotery AJ, Mannucci PM, Maouche S, Martinelli N, McKeown PP, Meisinger C, Meitinger T, Melander O, Merlini PA, Mooser V, Morgan T, Mühleisen TW, Muhlestein JB, Münzel T, Musunuru K, Nahrstaedt J, Nelson CP, Nöthen MM, Olivieri O, Patel RS, Patterson CC, Peters A, Peyvandi F, Qu L, Quyyumi AA, Rader DJ, Rallidis LS, Rice C, Rosendaal FR, Rubin D, Salomaa V, Sampietro ML, Sandhu MS, Schadt E, Schäfer A, Schillert A, Schreiber S, Schrezenmeir J, Schwartz SM, Siscovick DS, Sivananthan M, Sivapalaratnam S, Smith A, Smith TB, Snoep JD, Soranzo N, Spertus JA, Stark K, Stirrups K, Stoll M, Tang WH, Tennstedt S, Thorgeirsson G, Thorleifsson G, Tomaszewski M, Uitterlinden AG, van Rij AM, Voight BF, Wareham NJ, Wells GA, Wichmann HE, Wild PS, Willenborg C, Witteman JC, Wright BJ, Ye S, Zeller T, Ziegler A, Cambien F, Goodall AH, Cupples LA, Quertermous T, März W, Hengstenberg C, Blankenberg S, Ouwehand WH, Hall AS, Deloukas P, Thompson JR, Stefansson K, Roberts R, Thorsteinsdottir U, O'Donnell CJ, McPherson R, Erdmann J; CARDIoGRAM Consortium, Samani NJ; Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature Genetics*. 43(4), 333–338 (2011).
- 26 Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ; Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J*. 31(8), 918–925 (2010).
- 27 Paigen B, Albee D, Holmes PA, Mitchell D; Genetic analysis of murine strains C57BL/6J and C3H/HeJ to confirm the map position of Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility. *Biochem. Genet.* 25(7-8), 501–511 (1987).
- 28 Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL; Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 71(2), 343–353 (1992).
- 29 Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N; Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E.

- Science*. 258(5081), 468–471 (1992).
- 30 Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J; Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 92(2), 883–893 (1993).
 - 31 Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R; ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler. Thromb*. 14(1), 133–140 (1994).
 - 32 Teupser D, Tan M, Persky AD, Breslow JL; Atherosclerosis quantitative trait loci are sex-and lineage-dependent in an intercross of C57BL/6 and FVB/N low-density lipoprotein receptor–/–mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(1), 123–128 (2006).
 - 33 Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Winters RB, Albee D; Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis*. 10(2), 316–323 (1990).
 - 34 Schulte S, Sukhova GK, Libby P; Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *Am J Pathol*. 172(6), 1500–8 (2008).
 - 35 Libby P, Ridker PM, Hansson GK for the Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis; Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *Journal of the American College of Cardiology*. 54(23), 2129–2138 (2009).
 - 36 Cyrus T, Praticò D, Zhao L, Witztum JL, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA, Funk CD; Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*. 103(18), 2277–2282 (2001).
 - 37 Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E; Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(9), 2100–2105 (2000).
 - 38 Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ; Finding Genes That Underlie Complex Traits. *Science*. 298(5602), 2345–2349 (2002).
 - 39 Smith J; Quantitative trait locus mapping for atherosclerosis susceptibility. *Curr Opin Lipidol*. 14(5), 499–504 (2003).
 - 40 Manly KF, Cudmore RH, Meer JM; Map Manager QTX, cross-platform software

- for genetic mapping. *Mamm Genome*. 12(12), 930–932 (2001).
- 41 DiPetrillo K, Wang X, Stylianou IM, Paigen B; Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends in Genetics*. 21(12), 683–692 (2005).
 - 42 Burgess-Herbert SL, Cox A, Tsaih SW, Paigen B; Practical Applications of the Bioinformatics Toolbox for Narrowing Quantitative Trait Loci. *Genetics*. 180(4), 2227–2235 (2008).
 - 43 Darvasi A; Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genetics*. 18(1), 19–24 (1998).
 - 44 Schadt EE, Monks SA, Drake TA, Lusis AJ, Che N, Colinayo V, Ruff TG, Milligan SB, Lamb JR, Cavet G, Linsley PS, Mao M, Stoughton RB, Friend SH; Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature*. 422(6929), 297–302 (2003).
 - 45 Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D, Sieberts SK, Monks S, Reitman M, Zhang C, Lum PY, Leonardson A, Thieringer R, Metzger JM, Yang L, Castle J, Zhu H, Kash SF, Drake TA, Sachs A, Lusis AJ; An integrative genomics approach to infer causal associations between gene expression and disease. *Nature Genetics*. 37(7), 710–717 (2005).
 - 46 Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ; Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genetics*. 17(3), 280–284 (1997).
 - 47 Shaposhnik Z, Wang X, Trias J, Fraser H, Lusis AJ; The synergistic inhibition of atherogenesis in apoE^{-/-} mice between pravastatin and the sPLA2 inhibitor varespladib (A-002). *J Lipid Res*. 50(4), 623–629 (2008).
 - 48 Pearen MA, Muscat GE; Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease. *Molecular Endocrinology*. 24(10), 1891–1903 (2010).
 - 49 Mehrabian M, Castellani LW, Wen PZ, Wong J, Rithaporn T, Hama SY, Hough GP, Johnson D, Albers JJ, Mottino GA, Frank JS, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ; Genetic control of HDL levels and composition in an interspecific mouse cross (CAST/Ei x C57BL/6J). *J Lipid Res*. 41(12), 1936–1946 (2000).
 - 50 VanderLaan PA, Reardon CA, Thisted RA, Getz GS; VLDL best predicts aortic root atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *J Lipid Res*. 50(3), 376–385 (2008).
 - 51 Franssen R, Monajemi H, Stroes ESG, Kastelein JJ; Obesity and Dyslipidemia.

- Medical Clinics of North America*. 95(5), 893–902 (2011).
- 52 Nsengimana J, Samani NJ, Hall AS, Balmforth AJ, Mangino M, Yuldasheva N, Maqbool A, Braund P, Burton P, Bishop DT, Ball SG, Barrett JH; British Heart Foundation Family Heart Study Research Group; Enhanced linkage of a locus on chromosome 2 to premature coronary artery disease in the absence of hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet*. 15(3), 313–319 (2006).
- 53 Pajukanta P, Cargill M, Viitanen L, Nuotio I, Kareinen A, Perola M, Terwilliger JD, Kempas E, Daly M, Lilja H, Rioux JD, Brettin T, Viikari JS, Rönnemaa T, Laakso M, Lander ES, Peltonen L; Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland. *The American Journal of Human Genetics*. 67(6), 1481–1493 (2000).
- 54 Samani NJ, Burton P, Mangino M, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett J, Bishop T, Hall A; BHF Family Heart Study Research Group; A genomewide linkage study of 1,933 families affected by premature coronary artery disease: The British Heart Foundation (BHF) Family Heart Study. *The American Journal of Human Genetics*. 77(6), 1011–1020 (2005).

„Co-segregation of atherosclerosis and intermediate lipid phenotypes on Chr 2 in an intercross of C57BL/6 and BALBc/ByJ LDLR^{-/-} mice”

Cosegregation of Aortic Root Atherosclerosis and Intermediate Lipid Phenotypes on Chromosomes 2 and 8 in an Intercross of C57BL/6 and BALBc/ByJ Low-Density Lipoprotein Receptor^{-/-} Mice

Ralph Burkhardt, Simon Sündermann, Doris Ludwig, Uta Ceglarek, Lesca M. Holdt, Joachim Thiery, Daniel Teupser

Objective—We sought to identify novel atherosclerosis-modifying loci and their potential functional links in a genome-wide approach using cosegregation analysis of atherosclerosis and related intermediate phenotypes in mice.

Methods and Results—We carried out an F2 intercross between atherosclerosis-susceptible C57BL/6 mice and atherosclerosis-resistant BALB/cByJ mice on the low-density lipoprotein receptor^{-/-} background to examine the genetic basis for their differences in atherosclerosis susceptibility. Atherosclerotic lesion size and a comprehensive panel of 61 atherosclerosis-related phenotypes, including plasma levels of lipids, cytokines, and chemokines were measured in 376 F2 mice. Quantitative trait locus mapping revealed a novel significant locus (logarithm of odds, 6.18) for atherosclerosis on proximal mouse chromosome (Chr) 2 (Ath39), which was associated with major variations in lesion size (14%). Plasma very-low-density lipoprotein-cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, lanosterol, and phytosterol levels cosegregated with atherosclerosis at this locus. Moreover, these lipid traits showed significant correlations with lesion size, suggesting that they share the same underlying genetic factor. We also describe a second male-specific locus on Chr 8 (Ath40) where atherosclerosis and lipids cosegregated.

Conclusion—Our study revealed new loci for atherosclerosis susceptibility on mouse Chr 2 and 8, which might exert their effects on lesion size via plasma lipid levels. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:775-784.)

Key Words: atherosclerosis ■ genetically altered mice ■ lipids ■ lipoproteins ■ quantitative trait locus mapping

Despite successes in treatment of risk factors, atherosclerotic cardiovascular disease remains the major cause of morbidity and mortality in much of the world today.¹ Susceptibility to atherosclerosis is a complex genetic trait, determined by multiple genetic and environmental factors. Heritability estimates demonstrated that up to 50% of the disease susceptibility is attributable to genetics,² making genetic factors a major contributor to pathogenesis. Recently, genome-wide association studies in humans have led to the identification of several novel loci of atherosclerotic cardiovascular disease.³ Genetic differences in susceptibility to atherosclerosis have also been described between several inbred mouse strains^{4–6} and used in unbiased genome-wide linkage studies to map genomic regions and atherosclerosis-modulating genes. More than 30 quantitative trait loci (QTLs) for atherosclerosis have been identified by linkage mapping in mice, many of which exhibit corresponding loci in homologous regions in humans.⁷ Because it is likely that the same orthologous genes are responsible for concordant loci in mice

and humans, identifying atherosclerosis genes in mice can provide important new insights relevant to human pathology. This can be exemplified by the identification of *Alox5* (mice)/*ALOX5AP* (human) and *Tnfrsf4* (ox40L) as new atherosclerosis-modulating genes in mice and humans.^{8–10} The fact that most recent mouse linkage studies were able to identify new genomic regions for atherosclerosis suggests that our current inventory of QTLs is still incomplete and that crosses with different mouse strains might yield novel biological insights. C57BL/6 mice are widely used as an atherosclerosis-sensitive strain, whereas the distantly related BALB/cByJ strain was described to be atherosclerosis resistant when fed a high-cholesterol diet, supplemented with cholic acid or on the apolipoprotein E-deficient background.^{5,11} Notably, both strains also exhibit opposite T-cell polarization with regard to Th1 and Th2 response.^{12,13} This might add to their difference in atherosclerosis susceptibility because the immune system and inflammatory responses are important contributors to atherogenesis.¹⁴

Received on: August 2, 2010; final version accepted on: December 26, 2010.

From the Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, Germany (R.B., S.S., D.L., U.C., L.M.H., J.T., D.T.) and LIFE—Leipzig Research Center for Civilization Diseases, Universität Leipzig, Leipzig, Germany (R.B., U.C., L.M.H., J.T., D.T.). Drs Burkhardt and Sündermann contributed equally to this work.

Correspondence to Daniel Teupser, Institute of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, University Hospital Leipzig, Liebigstrasse 27, 04103 Leipzig, Germany. E-mail teupser@medizin.uni-leipzig.de

© 2011 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.213843

In the present study, we performed an intercross between C57BL/6 and BALB/cByJ mice on the low-density lipoprotein receptor (LDLR)^{-/-} background to examine the genetic bases for the differences in atherosclerosis susceptibility between these strains. We determined atherosclerotic lesion size and a comprehensive panel of 61 additional phenotypes, including plasma cytokines and metabolic parameters of sterol and lipoprotein metabolism, in the entire F2 generation. QTL mapping was performed for all 62 phenotypes, and we specifically investigated cosegregation between loci for atherosclerotic lesion size and atherosclerosis-modifying factors, hypothesizing that they share the same causal variant.

Methods

Mice

LDLR-deficient mice on the C57BL/6 background (B6.129S7-*Ldlr*^{tm1Her/J}, henceforth called B6.LDLR^{-/-}) and BALB/cByJ mice were obtained from the Jackson Laboratory. LDLR^{-/-} mice on the BALB/cByJ background (henceforth called BALB.LDLR^{-/-}) were generated in our laboratory by marker-assisted backcrossing. F1 and F2 animals were generated in 2 ways. In cross mBALB×fB6, male BALB.LDLR^{-/-} mice were crossed to female B6.LDLR^{-/-} mice, and the resulting F1s were intercrossed to generate 95 male and 95 female F2s. In cross mB6×fBALB, male B6.LDLR^{-/-} mice were crossed to female BALB.LDLR^{-/-} mice, and the F1s were intercrossed to generate 94 male and 92 female F2s. All mice were weaned at 28 days of age and fed a semisynthetic modified AIN76 diet containing 0.02% cholesterol for 16 weeks until euthanization.⁶ The sterol content of that diet is described in Supplemental Table I, available online at <http://atvb.ahajournals.org>. On the day of euthanization, food was removed from the cage, and mice were allowed access to water. Mice were anesthetized and exsanguinated by left-ventricular puncture into EDTA-containing syringes. The circulation was flushed with PBS, and the heart and brachiocephalic artery were removed and snap-frozen in Tissue-Tek OCT compound.⁶ Omental, perirenal, and parametral/epididymal fat pads, as well as liver and kidneys, were collected. Animals were housed in a specific pathogen-free environment, and all procedures involving mice were approved by the Regierungspräsidium Leipzig (N5/05, N6/06).

Blood Analyses

Clinical chemistry parameters were measured on automated analyzers (Modular PPE, Roche). Plasma lipoproteins were isolated by sequential ultracentrifugation at density <1.006 g/mL (very-low-density lipoprotein [VLDL]), 1.006≤d≤1.063 g/mL (intermediate density lipoprotein, low-density lipoprotein [LDL]), and d >1.063 g/mL (high-density lipoprotein [HDL]) as described.¹⁵ Phytosterols were measured by tandem mass spectrometry (atmospheric pressure photoionization [APPI] liquid chromatography-tandem mass spectrometry [LC-MS/MS]; API 3000) as described.¹⁶ Plasma cytokine levels were determined by multiplex cytokine immunoassays (Lincoplex) on a Bioplex Protein Array System analyzer (Bio-Rad) following the recommendations of the manufacturer.

Quantification of Atherosclerosis

To quantify cross-sectional lesion area in the aortic root, hearts frozen in OCT were processed and stained as previously described.⁶

Genome Scan

Genomic DNA was isolated from mouse tail tips. Genotyping was performed using a set of microsatellite markers previously screened to be polymorphic between B6 and BALB. Forward primers were fluorescently labeled with the dyes 6-carboxyfluorescein, 4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein, and 2,7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein. The reverse primers were unlabeled, but a GCTTCT sequence was attached to the 5' end

to reduce stutter bands. The markers were grouped into 13 panels of 8 to 10 markers each. The initial genome scan was done with 107 markers spaced at ≈15-cM intervals. Single-nucleotide polymorphisms used for fine mapping were obtained from databases (<http://www.informatics.jax.org/>) and experimentally verified by DNA sequencing. The 12 single-nucleotide polymorphisms for fine mapping were analyzed by melting curve analysis using a homogenous fluorescent method.¹⁷ All marker names, fluorescent labels, and paneling information are listed in Supplemental Table II. Genotyping was performed at the Genomics Resource Center of the Rockefeller University as previously described.¹⁵

RNA Isolation and Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from livers of 376 F2 mice using Trizol reagent and reverse transcribed into cDNA using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random hexamer primers. Quantitative fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction was performed in an ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Specific primers and probes for *Pla2r1* and *Nr4a2* were selected to span 2 exons to avoid coamplification of genomic DNA. mRNA expression levels were normalized to 10⁶ copies of *β-actin* as a housekeeping gene. Polymerase chain reaction conditions and primer and probe sequences for *Pla2r1*, *Nr4a2*, and *β-actin* are provided in Supplemental Table III.

Statistical Analysis and Bioinformatics

All data are expressed as mean±standard deviation unless otherwise indicated. Normality of distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test implemented in the Prism statistical software (GraphPad). Comparison of multiple groups was done using the Kruskal-Wallis test and the Dunn multiple comparison test as a post test, and comparison of 2 groups was done using the Mann-Whitney test. For linkage analysis, atherosclerotic lesion measurements were square root transformed to achieve normality. All other phenotypic traits significantly deviating from normal distributions were either log or square root transformed to achieve normality. Linkage analysis for single QTL was performed using MapManager QTX, version b20.¹⁸ Logarithm of odds (LOD) scores were calculated using the free model in MapManager QTX, and levels of significance for LOD scores were determined empirically by permutation testing (n=1000) in 1-cM steps. Information on syntenic regions between mice and humans was obtained from the Ensembl database (<http://www.ensembl.org>), and haplotype information was extracted using the Mouse Haplotype Block viewer (<http://mouse.perlegen.com/mouse/mousehap.html>). Information on genes mapping to mouse chromosome (Chr) 2 was accessed at Jax Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>). The Mouse Map Converter Tool (<http://cgd.jax.org/mousemapconverter/>) was applied to calculate physical positions from genetic map positions.

Results

Phenotyping of Parental B6.LDLR^{-/-} and BALB.LDLR^{-/-} F0 Mice

BALB.LDLR^{-/-} and B6.LDLR^{-/-} mice were euthanized after 16 weeks on a standardized semisynthetic diet and extensively phenotyped. Atherosclerotic lesion size at the aortic root and 61 additional traits, including anthropometric parameters, a comprehensive panel of metabolic parameters (including plasma concentrations of lipids, lipoproteins and sterol metabolites), and plasma concentrations of 20 cytokines and chemokines (Table), were determined. BALB.LDLR^{-/-} mice showed a marked resistance to atherosclerosis and developed significantly smaller lesions than B6.LDLR^{-/-} mice (Supplemental Figure IA and IB), which is in accordance with results in B6 and BALB strains from diet-induced atherosclerosis studies.⁵ Interestingly, both strains showed differences in their

Table. Atherosclerosis and Intermediate Phenotypes in Parental B6.LDLR^{-/-} and BALB.LDLR^{-/-} F0 Mice

	Males			Females		
	B6	BALB	P	B6	BALB	P
n	15	17		16	17	
Atherosclerosis aortic root, μm^2	51 919 \pm 30 644	5920 \pm 3104	<0.001	142 302 \pm 60 841	7220 \pm 6237	<0.001
Length, cm	9.2 \pm 2.2	9.2 \pm 0.25	NS	8.6 \pm 3.4	8.9 \pm 2.2	<0.05
Weight, g	28.0 \pm 7.6	28.1 \pm 2.8	NS	21.4 \pm 8.4	20.6 \pm 5.6	NS
Weight of omental fat, g	0.62 \pm 0.23	0.62 \pm 0.09	NS	0.43 \pm 0.17	0.43 \pm 0.13	NS
Weight of perirenal fat, g	0.36 \pm 0.21	0.34 \pm 0.08	NS	0.27 \pm 0.11	0.29 \pm 0.11	NS
Weight of epidym./param. fat, g	0.78 \pm 0.45	0.64 \pm 0.19	NS	0.30 \pm 0.13	0.33 \pm 0.14	NS
Weight of total fat, g	1.76 \pm 0.8	1.61 \pm 0.52	NS	1.00 \pm 0.30	1.05 \pm 0.27	NS
Weight of kidney, left, g	0.17 \pm 0.03	0.20 \pm 0.06	<0.05	0.14 \pm 0.04	0.17 \pm 0.03	<0.01
Weight of kidney, right, g	0.17 \pm 0.02	0.17 \pm 0.06	<0.01	0.13 \pm 0.03	0.17 \pm 0.03	<0.001
Cholesterol, mg/dL	533 \pm 244	334 \pm 116	<0.01	740 \pm 276	323 \pm 142	<0.001
VLDL-C, mg/dL	73.1 \pm 47.2	29.8 \pm 16.1	<0.001	191 \pm 80	22.9 \pm 8.4	<0.001
LDL-C, mg/dL	447 \pm 188	209 \pm 74	<0.001	585 \pm 174	236 \pm 57	<0.001
HDL-C, mg/dL	70.1 \pm 27.7	109 \pm 19	<0.001	34.8 \pm 13.8	65.0 \pm 9.7	<0.001
Triglycerides, mg/dL	145 \pm 76	200 \pm 88	<0.05	205 \pm 124	145 \pm 76	<0.05
VLDL-triglycerides, mg/dL	77.9 \pm 46.9	97.9 \pm 42.1	NS	100 \pm 52	56.4 \pm 25.3	<0.05
LDL-triglycerides, mg/dL	59.7 \pm 22.2	72.2 \pm 25.7	NS	64.2 \pm 26.4	60.9 \pm 28.4	NS
HDL-triglycerides, mg/dL	19.4 \pm 8.2	27.5 \pm 9.4	<0.05	20.0 \pm 10.1	25.1 \pm 11.3	NS
Free brassicasterol, mg/L	0.34 \pm 0.19	0.21 \pm 0.05	<0.05	0.67 \pm 0.27	0.26 \pm 0.07	<0.001
Esterified brassicasterol, mg/L	1.2 \pm 0.71	0.62 \pm 0.17	<0.001	3.3 \pm 1.3	0.99 \pm 0.24	<0.001
Total brassicasterol, mg/L	1.6 \pm 0.88	0.83 \pm 0.22	<0.001	4.0 \pm 1.5	1.3 \pm 0.3	<0.001
Brassicasterol/cholesterol	2.9 $\times 10^{-4}$ \pm 1.1 $\times 10^{-4}$	2.1 $\times 10^{-4}$ \pm 6.6 $\times 10^{-5}$	<0.001	4.9 $\times 10^{-4}$ \pm 1.1 $\times 10^{-4}$	3.1 $\times 10^{-4}$ \pm 5.6 $\times 10^{-5}$	NS
Free sitosterol, mg/L	2.6 \pm 1.3	0.95 \pm 0.32	<0.001	4.6 \pm 2.0	1.1 \pm 0.44	<0.001
Esterified sitosterol, mg/L	4.9 \pm 2.2	3.0 \pm 1.5	<0.05	7.0 \pm 2.3	2.8 \pm 0.9	<0.001
Total sitosterol, mg/L	7.5 \pm 3.5	4.0 \pm 1.7	<0.001	11.6 \pm 4.2	3.9 \pm 1.3	<0.001
Sitosterol/cholesterol	1.5 $\times 10^{-3}$ \pm 3.0 $\times 10^{-4}$	1.0 $\times 10^{-3}$ \pm 3.0 $\times 10^{-4}$	<0.01	1.3 $\times 10^{-3}$ \pm 3.0 $\times 10^{-4}$	1.0 $\times 10^{-3}$ \pm 6.0 $\times 10^{-4}$	NS
Free campesterol, mg/L	7.4 \pm 3.6	3.2 \pm 1.1	<0.001	12.4 \pm 3.4	4.3 \pm 1.4	<0.001
Esterified campesterol, mg/L	23.2 \pm 11.1	12.5 \pm 4.7	<0.001	43.1 \pm 12.7	17.2 \pm 4.8	<0.001
Total campesterol, mg/L	30.6 \pm 14.7	15.8 \pm 5.8	<0.001	55.4 \pm 16.2	21.4 \pm 7.9	<0.001
Campesterol/cholesterol	5.0 $\times 10^{-3}$ \pm 2.0 $\times 10^{-3}$	4.0 $\times 10^{-3}$ \pm 1.0 $\times 10^{-3}$	<0.01	7.0 $\times 10^{-3}$ \pm 7.0 $\times 10^{-4}$	5.0 $\times 10^{-3}$ \pm 1.0 $\times 10^{-3}$	<0.01
Free cholesterol, mg/L	1212 \pm 485	756 \pm 211	<0.01	1571 \pm 512	669 \pm 134	<0.01
Esterified cholesterol, mg/L	5023 \pm 1947	3429 \pm 763	<0.001	6178 \pm 1832	3313 \pm 507	<0.001
Total cholesterol, mg/L	6236 \pm 2430	4185 \pm 972	<0.001	7749 \pm 2334	3982 \pm 640	<0.001
Esterified cholesterol/cholesterol	0.81 \pm 0.01	0.82 \pm 0.01	<0.001	0.80 \pm 0.01	0.83 \pm 0.008	<0.001
Lanosterol, mg/L	0.26 \pm 0.17	0.11 \pm 0.05	<0.001	0.84 \pm 0.79	0.11 \pm 0.03	<0.001
Lanosterol/cholesterol	4.4 $\times 10^{-5}$ \pm 2.0 $\times 10^{-5}$	2.6 $\times 10^{-5}$ \pm 1.1 $\times 10^{-5}$	<0.05	1.0 $\times 10^{-4}$ \pm 1.0 $\times 10^{-4}$	2.8 $\times 10^{-5}$ \pm 1.4 $\times 10^{-5}$	<0.001
Interleukin-1 α , pg/mL	10.5 \pm 10.0	14.6 \pm 8.3	NS	19.1 \pm 14.3	17.0 \pm 12.2	NS
Interleukin-1 β , pg/mL	27.0 \pm 46.8	5.8 \pm 5.8	NS	35.2 \pm 62.0	5.7 \pm 6.7	NS
Interleukin-2, pg/mL	2.6 \pm 3.2	1.0 \pm 0.88	NS	2.1 \pm 1.7	1.2 \pm 0.85	NS
Interleukin-4, pg/mL	0.28 \pm 0.17	1.2 \pm 0.72	<0.05	1.8 \pm 1.4	0.77 \pm 0.50	NS
Interleukin-5, pg/mL	2.3 \pm 2.2	1.0 \pm 0.88	<0.05	2.2 \pm 2.0	1.8 \pm 0.67	NS
Interleukin-6, pg/mL	7.1 \pm 6.8	7.3 \pm 11.0	NS	11.3 \pm 8.3	7.9 \pm 11.4	NS
Interleukin-10, pg/mL	35.0 \pm 25.6	32.9 \pm 23.8	NS	59.8 \pm 50.8	42.2 \pm 41.4	NS
Interleukin-12 p40, pg/mL	136 \pm 48	130 \pm 38	NS	131 \pm 52	111 \pm 27	<0.05
Interleukin-12 p70, pg/mL	45.2 \pm 45.1	31.6 \pm 20.9	NS	77.0 \pm 88.7	47.3 \pm 43.0	NS
Interleukin-13, pg/mL	101 \pm 47	110 \pm 137	NS	432 \pm 477	85.6 \pm 43.2	<0.05

(Continued)

Table. Continued

	Males			Females		
	B6	BALB	P	B6	BALB	P
Interleukin-15, pg/mL	273±164	330±372	NS	556±459	312±157	<0.05
Interleukin-17, pg/mL	65.4±38.4	61.3±35.1	NS	97.3±65.0	84.4±55.2	NS
Interleukin-18, pg/mL	226±362	150±145	NS	510±816	102±73	<0.05
Interferon- γ , pg/mL	48.3±41.7	41.5±21.9	NS	82.5±75.6	64.0±62.7	NS
KC, pg/mL	14.1±7.9	18.8±9.5	NS	16.3±6.6	12.5±4.5	<0.05
MCP-1, pg/mL	47.6±37.9	30.4±13.0	NS	69.1±44.6	41.6±25.7	<0.05
RANTES, pg/mL	25.5±25.8	19.6±13.0	NS	29.3±28.2	16.2±13.5	NS
Tumor necrosis factor- α , pg/mL	2809±1475	2771±880	NS	3110±1637	2576±1058	NS
M-CSF, pg/mL	1645±749	1557±191	NS	1352±769	1629±241	NS
Vascular endothelial growth factor, pg/mL	64.8±24.3	69.9±23.3	NS	65.0±35.4	65.0±14.4	NS
Glucose, mg/dL	248±86	166±58	<0.001	260±125	212±94	<0.001
Total protein, g/L	47.1±12.0	49.2±12.1	<0.05	47.0±22.2	46.8±16.7	NS
GLDH, μ kat/L	0.36±0.65	0.34±0.45	NS	0.16±0.08	0.15±0.07	NS
ALAT, μ kat/L	0.92±0.92	0.51±0.17	NS	0.41±0.21	0.45±0.26	NS
ASAT, μ kat/L	2.3±2.0	1.72±0.72	NS	2.0±0.99	1.9±0.81	NS
Cholinesterase, μ kat/L	66.7±21.3	61.9±17.9	NS	92.5±43.6	86.5±30.3	NS
Coat color	Black	White		Black	White	

NS indicates not significant; epidym, epididymal; param, parametrial; KC, keratinocyte-derived chemokine; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; GLDH, glutamate dehydrogenase; ALAT, alanine aminotransferase; ASAT, aspartate aminotransferase.

lipid profiles, whereas strain effects on plasma cytokines and chemokines were negligible (Table). Because we observed significant sex differences for several traits, including lesion size (Supplemental Table IV), male and female mice were subsequently analyzed separately.

Genetic Determinants of Atherosclerosis in BALB.LDLR^{-/-} and B6.LDLR^{-/-} Mice

To identify genetic loci responsible for differences in atherosclerosis susceptibility, we generated 376 F2 mice by intercrossing BALB.LDLR^{-/-} and B6.LDLR^{-/-} mice and performed QTL mapping. Atherosclerotic lesion size at the aortic root in F2 mice showed a wide range of variation (Supplemental Figure 1A and 1B). As a major finding, we identified a novel QTL for atherosclerotic lesion size at the aortic root (Ath39) on proximal Chr 2 (Figure 1). This locus was present in male mice (LOD 6.18, empirical probability value <0.001, Figure 1A) and female mice (LOD 6.20, empirical probability value <0.001, Figure 1B), with similar fits in the additive and dominant models. The locus was associated with 14% of the variation in atherosclerotic lesion size in both sexes. For fine mapping, 3 additional single-nucleotide polymorphism markers were added to this locus. As shown in the interval maps in Figure 1, we observed the highest LOD score near D2Mit7 (28.0 cM, 38.1 Mb) in male mice (Figure 1A). In female mice (Figure 1B), the LOD score plot showed bimodal LOD peaks with a maximum near marker rs27192030 (34.4 Mb). We next analyzed the allelic contributions at this locus and found that the B6 allele was the risk allele conferring atherosclerosis susceptibility (Figure 1C and 1D).

To account for lineage effects on atherosclerosis susceptibility revealed in our previous work,¹⁵ the current cross had

been set up in a reciprocal fashion. To this end, 190 F2s had been generated by crossing male B6.LDLR^{-/-} mice to female BALB.LDLR^{-/-} mice and crossing the resulting F1s (cross mB6×fBALB). The remaining 186 F2s had been generated by crossing male BALB.LDLR^{-/-} mice with female B6.LDLR^{-/-} mice and crossing the resulting F1s (cross mBALB×fB6). However, lineage effects did not seem to exhibit a major influence on lesion size in this intercross, as the QTL on Chr 2 was supported in both subcrosses (Figure 1A and 1B) with similar genotypic effects (Figure 1C and 1D), and no differences in lesion size were observed between the 2 F2 subcrosses in males or females (Supplemental Figure 1C).

QTL Mapping for Genetic Determinants of Metabolic and Inflammatory Traits

We subsequently performed QTL mapping on 61 additional phenotypes, the majority representing traits related to atherosclerosis, to identify genetic loci contributing to these traits and investigate potential cosegregation patterns (Figure 2). Such colocalizations of QTLs for different traits would suggest the possibility that the same gene within the region affects multiple traits, which could provide hints to common pathophysiological pathways and facilitate identification of the causal gene. In our study, genetic factors leading to differences in plasma lipid levels strongly colocalized with lesion development, whereas the genetic contribution of immunologic factors was less apparent, and no significant genetic loci for plasma cytokine concentrations were identified (Figure 2). The latter observation was surprising because B6 and BALB mice have been recognized as Th1- and Th2-type immune response strains, respectively.^{12,13}

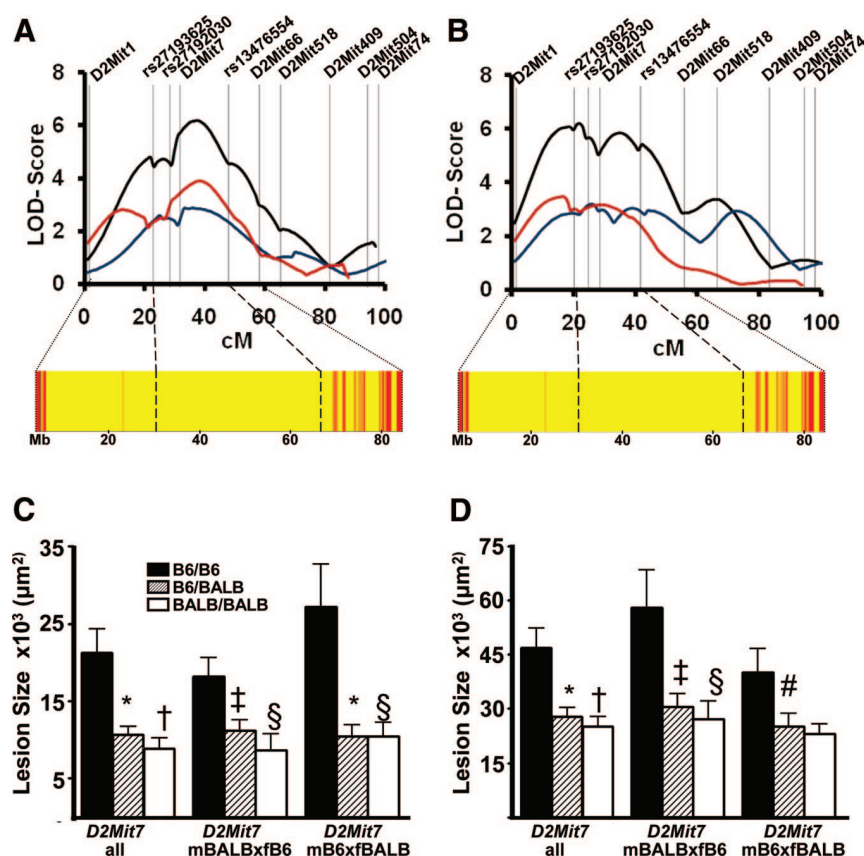


Figure 1. A and B, Chr 2 interval maps for atherosclerotic lesion size and identical by descent (IBD) analysis in male (A) and female (B) mice. Black line indicates entire F2 cohorts; red, cross mBALB×fB6; blue, cross mB6×fBALB. In the bottom panel, IBD segments are shown in yellow and non-IBD segments in red. C and D, Allelic contributions of genotypes to lesion size at marker D2Mit7 in male (C) and female (D) F2 mice. * $P<0.001$, B6/B6 versus B6/BALB; † $P<0.001$, B6/B6 versus BALB/BALB; ‡ $P<0.01$, B6/B6 versus B6/BALB; § $P<0.01$, B6/B6 versus BALB/BALB; # $P<0.05$, B6/B6 versus B6/BALB.

Cosegregation of Atherosclerosis and Lipid Traits at Chr 2

Notably, we identified cosegregation for traits related to lipid and sterol metabolism with the novel atherosclerosis locus on Chr 2 (Figure 2). The pattern was more pronounced in males (Figure 2A), in which we observed highly significant QTLs for the phytosterol brassicasterol (LOD 5.7, $P<0.001$) and the cholesterol precursor lanosterol (LOD 5.3, $P<0.001$) peaking between D2Mit7 (38.1 Mb) and rs13476554 (67.1 Mb) (Figure 3A). The same genomic location also harbored significant QTLs for plasma VLDL-cholesterol (VLDL-C) (LOD 3.64, $P=0.03$) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (LOD 3.56, $P=0.036$) (Figure 3A). Analysis of the allelic contributions showed that the B6 allele, in addition to conferring increased lesion size, was also conferring a less favorable lipid profile. The B6 allele increased plasma brassicasterol (Figure 3B), lanosterol (Figure 3C), and VLDL-C (Figure 3D) and decreased plasma HDL-C (Figure 3E). No effect was observed for plasma LDL-C (Figure 3F).

Identification of a Novel Sterol QTL at Chr 8

In addition to the Chr 2 locus, we identified a second novel QTL cluster on Chr 8 for plasma plant sterols colocalizing with a suggestive QTL for atherosclerotic lesion size (Ath40). These QTLs were sex specific and were present only in male mice (Figures 2A and 4A). The Chr 8 QTL for plasma concentrations of the phytosterols brassicasterol (LOD 5.29, $P<0.001$), sitosterol (LOD 5.86, $P<0.001$), and campesterol (LOD 3.86, $P=0.023$) peaked near D8Mit65, where we also mapped suggestive loci for atherosclerotic lesion size (LOD 3.28, $P=0.09$)

and LDL-C (LOD 2.95, $P=0.16$) (Figure 4A). The B6 allele displayed an additive effect, increasing atherosclerotic lesion size (Figure 4B), plasma levels of phytosterols (Figure 4C to 4E), and LDL-C (Figure 4F). In contrast to the Chr 2 locus, no significant linkage was observed for VLDL-C and HDL-C (Figure 4A). Because normalization of phytosterol traits to plasma cholesterol levels significantly decreased effects (Figure 2A), it is possible that the parallel increase of phytosterols and lipoprotein cholesterol was due to the binding of phytosterols to lipoproteins.

Correlation of Plasma Lipids With Atherosclerosis in F2

At the Chr 2 and Chr 8 loci, the B6 allele represented the risk allele, and the mode of inheritance was similar for plasma sterols, lipoprotein levels, and atherosclerotic lesions, raising the possibility that genetic factors contributing to lesion development in this cross were acting through plasma lipids, particularly in males. We therefore calculated correlations of these traits with atherosclerosis lesion size in the F2 (Figure 5). Overall, the strongest correlation with lesion size was observed for LDL-C ($r^2=0.24$, Figure 5A), followed by brassicasterol ($r^2=0.15$, Figure 5B), VLDL-C ($r^2=0.11$, Figure 5C), and lanosterol ($r^2=0.05$, Figure 5D). The correlation with HDL-C was weak and showed an inverse effect ($r^2=0.04$, Figure 5E). Normalizing brassicasterol to cholesterol abolished the correlation with lesion size (Figure 5F), suggesting that higher plasma plant sterols might be indicative of higher LDL-C and VLDL-C and reflect a higher concentration of plant sterols traveling with these lipo-

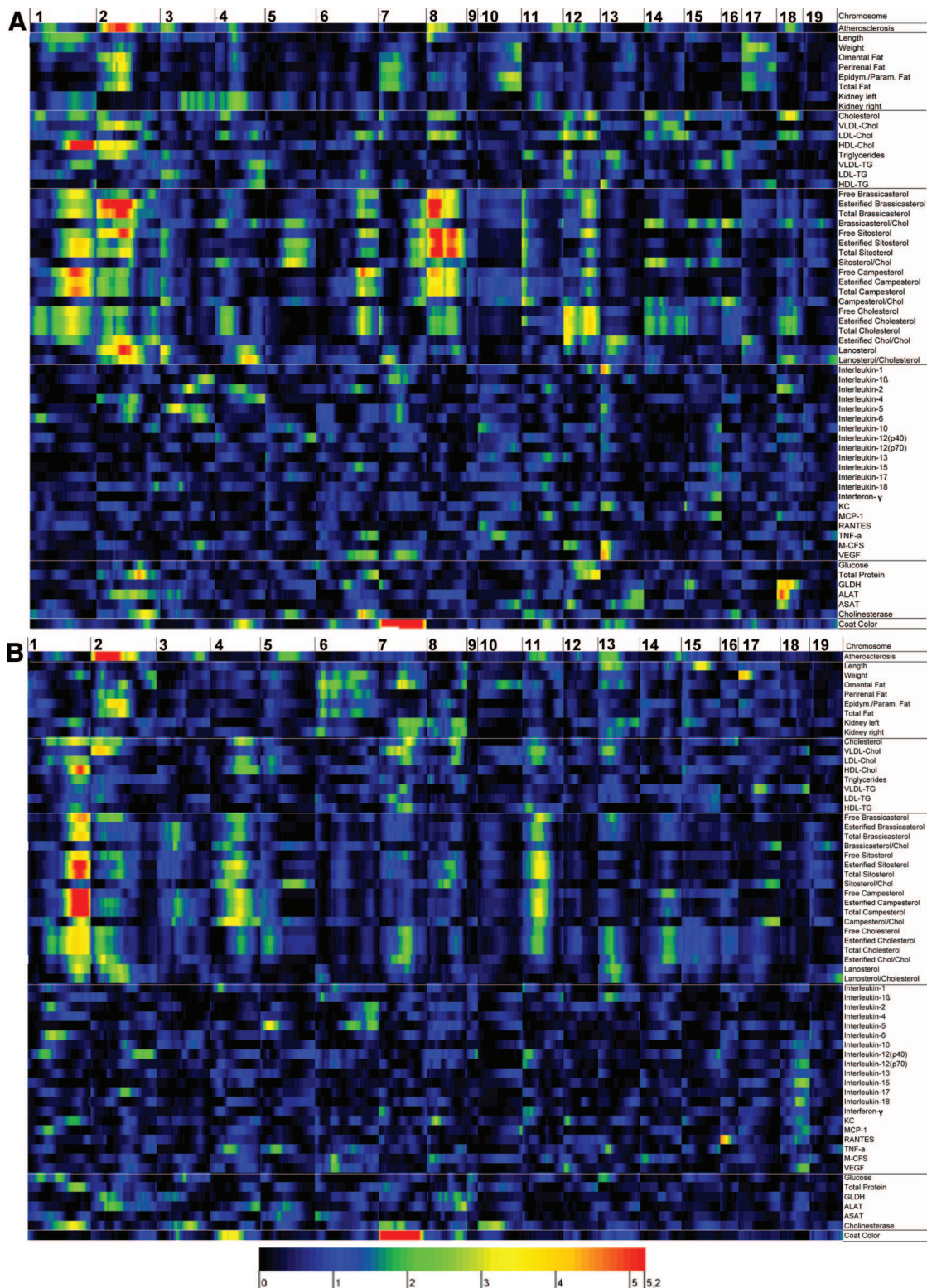


Figure 2. Heat-map of genome-wide linkage analysis for 62 traits in male (A) and female (B) F2 mice. Chr numbers (1–19) are shown at the top. LOD scores for different phenotypes (shown on the right) are indicated by coloration (legend is shown at the bottom of B).

proteins. This hypothesis was further supported by the highly significant correlations between brassicasterol and LDL-C ($r^2=0.41$, Supplemental Figure IIA) and between brassicasterol and VLDL-C ($r^2=0.14$, Supplemental Figure IIB).

Potential Candidate Genes at Chr 2

At the novel QTL on Chr 2, atherosclerotic lesion size colocalized with plasma levels of plant sterols, lanosterol, VLDL-C, and HDL-C. The 95% support interval (defined by

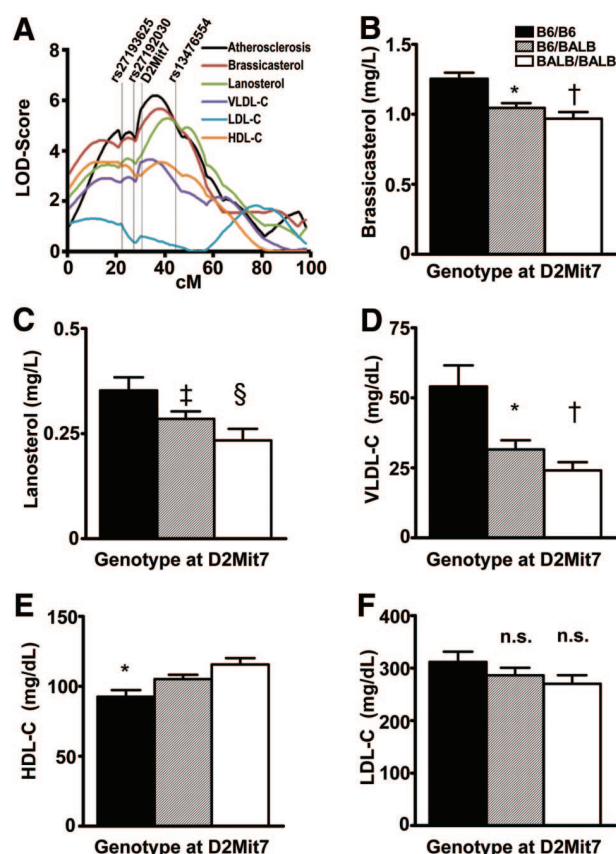


Figure 3. A, Interval map of Chr 2 for lesion size, brassicasterol, lanosterol, VLDL-C, LDL-C and HDL-C concentrations in males. B to F, Allelic contributions of genotypes to plasma brassicasterol (B), lanosterol (C), VLDL-C (D), HDL-C (E), and LDL-C (F) in males at marker D2Mit7.

the 1.5 LOD score drop) of the QTL for lesion size is flanked by single-nucleotide polymorphisms rs27192030 (34.40 Mb) and rs13476553 (67.08 Mb) and spans ≈ 32.68 Mb. This interval contains 219 genes (Jax Mouse Informatics Database, accessed July 2010; see Supplemental Table V), 61 of which were only predicted genes. Among the remaining 158 annotated genes, 27 genes encoded olfactory receptors, and we did not consider these likely candidates. We then attempted to reduce the remaining list of 131 candidate genes by applying several strategies. First, we sought to identify regions within this locus that were nonidentical by descent (non-IBD) between the B6 and BALB parental strains, because such regions have a higher probability to contain the causal gene. However, an analysis of the ancestral haplotypes at this locus suggested that it was entirely IBD (Figure 1A and 1B) between the B6 and BALB strains. Thus, incorporating information on ancestral haplotypes did not allow further reduction of the interval.

Comparative genomics has been applied as an additive approach to reduce the size of QTL intervals and identify potential candidate genes.¹⁹ This approach assumes that the same culprit gene is causal for a QTL in mice and humans if QTL exist at syntenic chromosomal regions. Indeed, several linkage studies in humans mapped atherosclerosis QTLs to Chr 2q22.1 (confidence interval, 2q21.2 to 24.3),^{20–22} which was

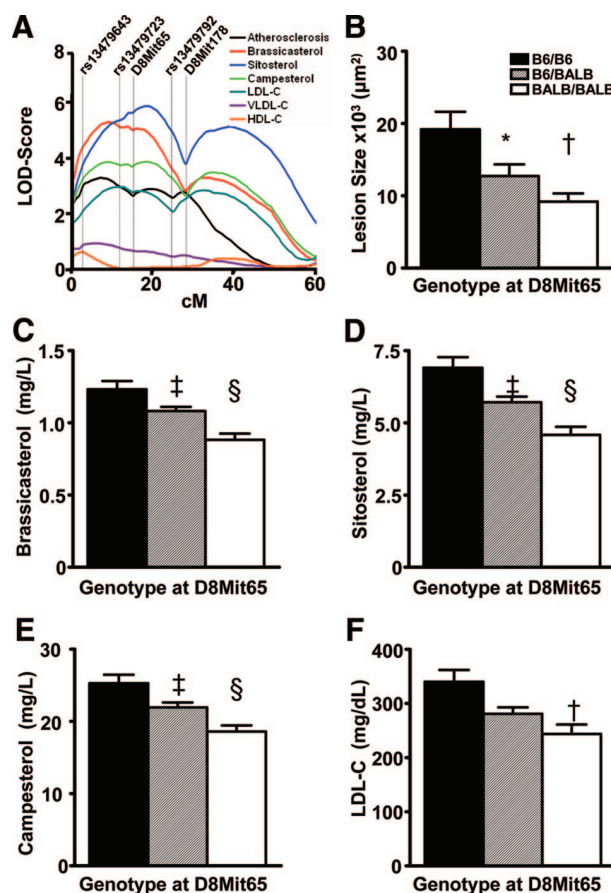


Figure 4. A, Interval map of Chr 8 for lesion size and lipid phenotypes in males. B to F, Allelic contributions of genotypes to lesion size (B), brassicasterol (C), sitosterol (D), campesterol (E), and LDL-C (F) in males at marker D8Mit65. * $P < 0.001$, B6/B6 versus B6/BALB; † $P < 0.001$, B6/B6 versus BALB/BALB; ‡ $P < 0.01$, B6/B6 versus B6/BALB; § $P < 0.01$, B6/B6 versus BALB/BALB.

reported to correspond to mouse Chr 2 between 30 and 38 cM.²³ Using Mouse Map Converter,²⁴ we transformed the genetic coordinates for this region to physical coordinates, resulting in a ≈ 12.3 -Mb candidate region (52.30 to 64.60 Mb). The remaining candidate region harbored 63 genes, 19 of which were predicted genes. Thus, applying comparative genetics might allow reduction to 44 candidate genes at this locus (Supplemental Table V). Two notable candidate genes identified by their potential role in the pathophysiology of atherosclerosis were located in this region: *Pla2r1*, encoding a receptor for secretory phospholipase A2 and *Nr4a2*, encoding the orphan nuclear receptor NURR1. Several studies in mice and humans have linked NURR1 and secretory phospholipase A2, the ligand of PLA2R1, to lipoprotein metabolism, lipolysis, foam cell formation, and development of atherosclerosis.^{25–28} We investigated liver expression of both genes and performed expression QTL mapping in F2 mice to test whether we could detect significant differences in transcript levels based on allele status. Both genes were expressed in liver, but we did not detect significant expression differences or expression QTLs in F2 mice (Supplemental Figure III). Therefore, variants influencing liver expression of

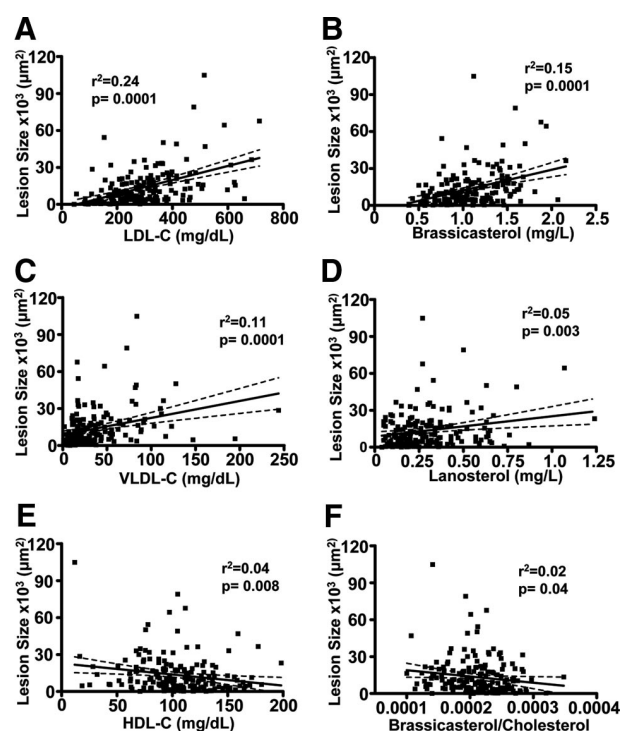


Figure 5. Correlation of atherosclerotic lesion size with LDL-C (A), brassicasterol (B), VLDL-C (C), lanosterol (D), HDL-C (E), and brassicasterol/cholesterol (F) in male mice.

Pla2r1 and *Nurr1* were not deemed likely as causative mechanisms, and other unbiased approaches are necessary to ultimately identify the culprit gene(s) at the Chr 2 locus.

Discussion

In the current study, we used an intercross between B6 and BALB mouse strains on the *LDLR*^{-/-} background to identify genomic regions that harbor QTLs for atherosclerosis. We identified a novel, strong locus for atherosclerotic lesion size at the aortic root on proximal Chr 2 (Ath39). To investigate potential mechanisms modulating atherosclerosis in this cross, we also determined a comprehensive panel of metabolic and system-related traits, including plasma levels of 20 cytokines and chemokines, and performed QTL mapping for these parameters. At Chr 2, lesion size colocalized with loci for plasma VLDL-C, HDL-C, the cholesterol biosynthesis marker lanosterol and the plant sterol brassicasterol. In male mice, a second QTL cluster for plasma plant sterol concentrations was identified on Chr 8, where we also mapped a suggestive QTL for atherosclerotic lesion size (Ath40) and LDL-C. Moreover, plasma lipid and sterol concentrations were significantly correlated with lesion size, raising the possibility that genetic factors contributing to lesion development in this cross were acting through plasma lipids.

Although our study is the first to map a QTL for lesion size to proximal Chr 2, previous studies had mapped QTLs for plasma lipids and metabolic traits to proximal Chr 2: HDL1, a locus for plasma HDL-C near D2Mit9 (65.2 Mb), was first reported in a cross of CAST/Ei and C57BL/6J²⁹ and later confirmed in a cross of CAST and DBA mice.³⁰ Furthermore, Mob7, a locus for subcutaneous-/retroperitoneal-fat was also

mapped to D2Mit9 (using CAST/Ei and C57BL/6 strains),³¹ and more recently, loci for body weight, fat mass, and adipocyte size overlapping with Mob7 were identified in an independent model.³² Interestingly, besides significant linkage for atherosclerosis and plasma sterols, we also observed suggestive linkage for fat mass in our study (Figure 2).

With regard to plasma plant sterol concentrations, Sehaye et al³³ mapped *Plast2a* near D2Mit296 (31.18 Mb) in a cross between Casa and C57BL/6J strains. Identically to our study, inheritance of the B6 allele increased plant sterol levels. Elevated concentrations of plasma plant sterols have been discussed as a potential risk factor for coronary artery disease in mice and humans.³⁴ This view was supported by a recent mendelian randomization study in humans, which revealed that loci for plant sterols identified by genome-wide association showed concordant associations with coronary artery disease.³⁵ In the present study, we also observed colocalization between brassicasterol and lesion size and significant correlations between these traits. Even though plasma concentrations of plant sterols are substantially lower than for cholesterol, a mechanistic link cannot be excluded. Deposits of plant sterols have been found in atherosclerotic lesions,³⁶ and patients with sitosterolemia, a rare autosomal disease caused by mutations in *ABCG5/8*, display severe accumulation of phytosterols and subsequently develop atherosclerosis.³⁷ On the functional level, it has been shown that sitosterol-containing lipoproteins trigger free sterol-induced caspase-independent death in *acyl-CoA:cholesterol acyltransferase* competent macrophages and might thus promote atherosclerosis.³⁸ However, VLDL-C and HDL-C also mapped to the same region on Chr 2, making it difficult to separate a putative effect of high plant sterol levels from other lipid risk factors. Moreover, normalizing plant sterol levels to plasma cholesterol abolished the linkage signal. Therefore, we hypothesize that plant sterols might instead be indicative of higher VLDL-C and reflect a higher concentration of plant sterols traveling on VLDL-C. One might also speculate that a common genetic modulator influences both traits by affecting sterol absorption in intestinal cells or hepatic excretion of sterols into bile.

Although we found the best correlation between LDL-C and lesion size, LDL-C did not map to the strongest locus for lesion size at Chr 2. However, a robust correlation and colocalization with lesion size at Chr 2 was observed for VLDL-C. It is also possible that the Chr 2 locus is complex and harbors closely linked but separate genes affecting plasma lipids and atherosclerosis. Cosegregation of plasma plant sterols, lipids, and atherosclerotic lesion size was also observed in a second novel, male-specific QTL on Chr 8. The associated interval contains 370 genes, 74 of which are only predicted genes (Supplemental Table VI). Interestingly, a haplotype block containing 3 genes (*NCAN*, *CILP2*, and *PBX4*) residing at the Chr 8 QTL interval was recently discovered in a genome-wide association study to be associated with total cholesterol, LDL-C, triglycerides, and risk for myocardial infarction in humans.³⁹ The culprit gene and its links to lipid metabolism and myocardial infarction remain unknown; however, the evidence from human studies makes

these 3 genes priority candidates for future investigations aimed at elucidating the causal gene at this locus.

In addition to lipids, the immune system is widely recognized to influence atherogenesis, and a proatherogenic role has been postulated for most Th1 cytokines.¹⁴ B6 mice exhibit a predominant Th1-immune response, whereas BALB mice exhibit a predominant Th2-immune response,^{12,13} implying that opposite T-cell polarization might convey some of the genetic difference in atherosclerosis susceptibility between these strains. It was therefore surprising that we could not detect significant QTLs for plasma concentrations of 20 cytokines and chemokines. Because plasma cytokine concentrations might not accurately reflect the local milieu of cytokines in the arterial wall, one cannot exclude a significant contribution of genetically programmed differences in Th1/Th2 response on atherosclerotic lesion formation and quality in these strains. Also, in our study, plasma concentrations for many prototypic Th1/Th2 cytokines were comparable in the parental strains (Table). Contrary to our observations, Schulte et al¹¹ reported significant differences in interleukin-6 plasma levels between BALB and B6 mice on the apolipoprotein E-deficient background. It is conceivable that the lack of replication of this finding in our study is due to a different atherosclerosis sensitizing mutation (apolipoprotein E) or a diet with significantly higher fat (40% kcal) and cholesterol (1.25%) content in the study of Schulte et al,¹¹ resulting in larger atherosclerotic lesions and a higher inflammatory burden.

Despite several lines of evidence pointing to proximal Chr 2 as a locus carrying a gene involved in lipid metabolism, body fat regulation, and now atherosclerosis, the underlying gene or genes at this locus have yet to be identified. Bioinformatics based strategies to narrow QTL intervals and identify the culprit variant include the use of ancestral haplotypes and comparative genomics approaches. Comparative genomics is based on the assumption that the same genes underlie QTL in syntenic regions of different species. The syntenic region in humans for parts of the mouse Chr 2 QTL support interval maps to Chr 2q22.1 to 2q32.1, a region where several linkage studies in humans mapped QTL for coronary heart disease and HDL-C.^{20–22} Based on a literature search for genes mapping to the syntenic regions, we prioritized 2 candidate genes with links to lipid metabolism and atherosclerosis for functional studies. We determined liver mRNA expression of *Nurr1* and *Pla2r1* in F2 mice, but we did not detect expression differences based on allele status at D2Mit7. However, this finding does not completely rule out the possibility that expression differences of either of the genes are responsible for the atherosclerosis QTL at this locus because other tissues might show an expression QTL mapping.⁴⁰

A limitation of the present study was that we were unable to further reduce the QTL interval by applying a haplotype block analysis, because it was mainly IBD, indicative of a high level of conservation between the 2 strains. This finding represents an interesting case for a QTL region, because IBD regions are commonly excluded in bioinformatics approaches used to narrow QTL intervals under the assumption that shared ancestral regions are unlikely to contain the culprit variant. The causal mutation underlying the QTL in our study has most likely arisen

as a de novo mutation after the separation of strains. Next-generation sequencing technology now enables efficient sequencing of large genomic regions, and the Chr 2 interval might be a case in point for the use of next-generation sequencing to unravel the causative mutation(s) in the gene(s) modulating plasma sterols and atherosclerosis.

In summary, cosegregation analysis identified new QTLs for atherosclerotic lesion size, lanosterol, VLDL-C, HDL-C and brassicasterol on proximal Chr 2 by intercrossing B6 and BALB mice on the LDLR^{-/-} background. Our data are supported by linkage studies in humans that mapped QTL for atherosclerosis and HDL-C to the syntenic region. Because the QTL interval is IBD in the parental strains, we propose next-generation sequencing as an effective tool for refining the linkage peak and identifying the underlying causal gene.

Acknowledgments

We thank Franziska Jeromin, Claudia Weise, Babette Niescher, and Wolfgang Wilfert for excellent technical assistance.

Sources of Funding

This study was supported by the University of Leipzig, Deutsche Forschungsgemeinschaft Grant Te 342/5-1 (to D.T.), and by LIFE—Leipzig Research Center for Civilization Diseases, Universität Leipzig. LIFE is funded by means of the European Union, by the European Regional Development Fund, and by means of the Free State of Saxony within the framework of the excellence initiative.

Disclosures

None.

References

- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006;3:e442.
- Lusis AJ, Fogelman AM, Fonarow GC. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation*. 2004;110:1868–1873.
- Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ. Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J*. 2010;31:918–925.
- Dansky HM, Charlton SA, Sikes JL, Heath SC, Simantov R, Levin LF, Shu P, Moore KJ, Breslow JL, Smith JD. Genetic background determines the extent of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1960–1968.
- Paigen B, Mitchell D, Reue K, Morrow A, Lusis AJ, LeBoeuf RC. Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:3763–3767.
- Teupser D, Persky AD, Breslow JL. Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1907–1913.
- Chen Y, Rollins J, Paigen B, Wang X. Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. *Cell Metab*. 2007;6:164–179.
- Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2004;350:29–37.
- Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang X, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ, Shih W. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res*. 2002;91:120–126.
- Wang X, Ria M, Kelmenson PM, Eriksson P, Higgins DC, Samnegard A, Petros C, Rollins J, Bennet AM, Wiman B, de Faire U, Wennberg C, Olsson PG, Ishii N, Sugamura K, Hamsten A, Forsman-Semb K, Lagercrantz J, Paigen B. Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nat Genet*. 2005;37:365–372.
- Schulte S, Sukhova GK, Libby P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *Am J Pathol*. 2008;172:1500–1508.

12. Gessner A, Blum H, Rollinghoff M. Differential regulation of IL-9-expression after infection with leishmania major in susceptible and resistant mice. *Immunobiology*. 1993;189:419–435.
13. Locksley RM, Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Gardner KD Jr. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. *Ann Inst Pasteur Immunol*. 1987;138:744–749.
14. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:2129–2138.
15. Teupser D, Tan M, Persky AD, Breslow JL. Atherosclerosis quantitative trait loci are sex- and lineage-dependent in an intercross of C57BL/6 and FVB/N low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:123–128.
16. Lembecke J, Ceglarek U, Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, Thiery J. Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. *J Lipid Res*. 2005;46:21–26.
17. Teupser D, Mueller MA, Koglin J, Wilfert W, Ernst J, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, Thiery J. Cd36 mRNA expression is increased in CD14⁺ monocytes of patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:552–556.
18. Manly KF, Cudmore RH Jr, Meer JM. Map manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome*. 2001;12:930–932.
19. Burgess-Herbert SL, Cox A, Tsaih SW, Paigen B. Practical applications of the bioinformatics toolbox for narrowing quantitative trait loci. *Genetics*. 2008;180:2227–2235.
20. Nsengimana J, Samani NJ, Hall AS, Balmforth AJ, Mangino M, Yuldasheva N, Maqbool A, Braund P, Burton P, Bishop DT, Ball SG, Barrett JH. Enhanced linkage of a locus on chromosome 2 to premature coronary artery disease in the absence of hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet*. 2007;15:313–319.
21. Pajukanta P, Cargill M, Viitanen L, Nuotio I, Kareinen A, Perola M, Terwilliger JD, Kempas E, Daly M, Lilja H, Rioux JD, Brettin T, Viikari JS, Ronnemaa T, Laakso M, Lander ES, Peltonen L. Two loci on chromosomes 2 and X for premature coronary heart disease identified in early- and late-settlement populations of Finland. *Am J Hum Genet*. 2000;67:1481–1493.
22. Samani NJ, Burton P, Mangino M, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett J, Bishop T, Hall A. A genomewide linkage study of 1,933 families affected by premature coronary artery disease: the British Heart Foundation (BHF) family heart study. *Am J Hum Genet*. 2005;77:1011–1020.
23. Wang X, Ishimori N, Korstanje R, Rollins J, Paigen B. Identifying novel genes for atherosclerosis through mouse-human comparative genetics. *Am J Hum Genet*. 2005;77:1–15.
24. Cox A, Ackert-Bicknell CL, Dumont BL, Ding Y, Bell JT, Brockmann GA, Wergedal JE, Bult C, Paigen B, Flint J, Tsaih SW, Churchill GA, Broman KW. A new standard genetic map for the laboratory mouse. *Genetics*. 2009;182:1335–1344.
25. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, Arkenbout EK, Seppen J, Spek CA, van der Poll T, Pannekoek H, de Vries CJ. Nuclear receptors Nur77, Nurrl, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2288–2294.
26. Shaposhnik Z, Wang X, Trias J, Fraser H, Lusis AJ. The synergistic inhibition of atherogenesis in apoE^{-/-} mice between pravastatin and the sPLA2 inhibitor varespladib (A-002). *J Lipid Res*. 2009;50:623–629.
27. Pearen MA, Muscat GE. Minireview: nuclear hormone receptor 4a signaling: implications for metabolic disease. *Mol Endocrinol*. 2010.
28. Oorni K, Kovanen PT. Lipoprotein modification by secretory phospholipase A(2) enzymes contributes to the initiation and progression of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20:421–427.
29. Mehrabian M, Castellani LW, Wen PZ, Wong J, Rithaporn T, Hama SY, Hough GP, Johnson D, Albers JJ, Mottino GA, Frank JS, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic control of HDL levels and composition in an interspecific mouse cross (CAST/Ei×C57BL/6J). *J Lipid Res*. 2000;41:1936–1946.
30. Lyons MA, Wittenburg H, Li R, Walsh KA, Churchill GA, Carey MC, Paigen B. Quantitative trait loci that determine lipoprotein cholesterol levels in DBA/2J and CAST/Ei inbred mice. *J Lipid Res*. 2003;44:953–967.
31. Mehrabian M, Wen PZ, Fisler J, Davis RC, Lusis AJ. Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model. *J Clin Invest*. 1998;101:2485–2496.
32. Mizutani S, Gomi H, Hirayama I, Izumi T. Chromosome 2 locus Nidd5 has a potent effect on adiposity in the TSOD mouse. *Mamm Genome*. 2006;17:375–384.
33. Sehaye E, Duncan EM, Lutjohann D, Von Bergmann K, Ono JG, Batta AK, Salen G, Breslow JL. Loci on chromosomes 14 and 2, distinct from ABCG5/ABCG8, regulate plasma plant sterol levels in a C57BL/6J×CASA/Rk intercross. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:16215–16219.
34. Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, Lutjohann D, Winkelmann BR, Boehm BO, Marz W. The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause- and cardiovascular mortality. *J Lipid Res*. 2010.
35. Teupser D, Baber R, Ceglarek U, Scholz M, Illig T, Gieger C, Holdt LM, Leichtle A, Greiser KH, Huster D, Linsel-Nitschke P, Schafer A, Braund PS, Tired L, Stark K, Raaz-Schrauder D, Fiedler GM, Wilfert W, Beutner F, Gielen S, Grosshennig A, König IR, Lichtner P, Heid IM, Kluttig A, El Mokhtari NE, Rubin D, Ekici AB, Reis A, Garlisch CD, Hall AS, Matthes G, Wittekind C, Hengstenberg C, Cambien F, Schreiber S, Werdan K, Meitinger T, Loeffler M, Samani NJ, Erdmann J, Wichmann HE, Schunkert H, Thiery J. Genetic regulation of serum phytosterol levels and risk of coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:331–339.
36. Mellies MJ, Ishikawa TT, Glueck CJ, Bove K, Morrison J. Phytosterols in aortic tissue in adults and infants. *J Lab Clin Med*. 1976;88:914–921.
37. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent abc transporters. *Science*. 2000;290:1771–1775.
38. Bao L, Li Y, Deng SX, Landry D, Tabas I. Sitosterol-containing lipoproteins trigger free sterol-induced caspase-independent death in ACAT-competent macrophages. *J Biol Chem*. 2006;281:33635–33649.
39. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, Pirruccello JP, Ripatti S, Chasman DI, Willer CJ, Johansen CT, Fouchier SW, Isaacs A, Peloso GM, Barbalic M, Ricketts SL, Bis JC, Aulchenko YS, Thorleifsson G, Feitosa MF, Chambers J, Orho-Melander M, Melander O, Johnson T, Li X, Guo X, Li M, Shin Cho Y, Jin Go M, Jin Kim Y, Lee JY, Park T, Kim K, Sim X, Tzee-Hee Ong R, Croteau-Chonka DC, Lange LA, Smith JD, Song K, Hua Zhao J, Yuan X, Luan J, Lamina C, Ziegler A, Zhang W, Zee RY, Wright AF, Witteman JC, Wilson JF, Willemsen G, Wichmann HE, Whitfield JB, Waterworth DM, Wareham NJ, Waeber G, Vollenweider P, Voight BF, Vitart V, Uitterlinden AG, Uda M, Tuomilehto J, Thompson JR, Tanaka T, Surakka I, Stringham HM, Spector TD, Soranzo N, Smit JH, Sinisalo J, Silander K, Sijbrands EJ, Scuteri A, Scott J, Schlessinger D, Sanna S, Salomaa V, Saharinen J, Sabatti C, Ruokonen A, Rudan I, Rose LM, Roberts R, Rieder M, Psaty BM, Pramstaller PP, Pichler I, Perola M, Penninx BW, Pedersen NL, Pattaro C, Parker AN, Pare G, Oostra BA, O'Donnell CJ, Nieminen MS, Nickerson DA, Montgomery GW, Meitinger T, McPherson R, McCarthy MI, McArdle W, Masson D, Martin NG, Marroni F, Mangino M, Magnusson PK, Lucas G, Luben R, Loos RJ, Lokki ML, Lettre G, Langenberg C, Launer LJ, Lakatta EG, Laaksonen R, Kyvik KO, Kronenberg F, König IR, Khaw KT, Kaprio J, Kaplan LM, Johansson A, Jarvelin MR, Janssens AC, Ingelsson E, Igl W, Kees Hovingh G, Hottenga JJ, Hofman A, Hicks AA, Hengstenberg C, Heid IM, Hayward C, Havulinna AS, Hastie ND, Harris TB, Haritunians T, Hall AS, Gyllenstein U, Guiducci C, Groop LC, Gonzalez E, Gieger C, Freimer NB, Ferrucci L, Erdmann J, Elliott P, Ejebe KG, Doring A, Dominiczak AF, Demissie S, Deloukas P, de Geus EJ, de Faire U, Crawford G, Collins FS, Chen YD, Caulfield MJ, Campbell H, Burtt NP, Bonnycastle LL, Boomsma DI, Boekholdt SM, Bergman RN, Barroso I, Bandinelli S, Ballantyne CM, Assimes TL, Quertermous T, Altshuler D, Seielstad M, Wong TY, Tai ES, Feranil AB, Kuzawa CW, Adair LS, Taylor HA Jr, Borecki IB, Gabriel SB, Wilson JG, Holm H, Thorsteinsdottir U, Gudnason V, Krauss RM, Mohlke KL, Ordovas JM, Munroe PB, Kooner JS, Tall AR, Hegele RA, Kastelein JJ, Schadt EE, Rotter JJ, Boerwinkle E, Strachan DP, Mooser V, Stefansson K, Reilly MP, Samani NJ, Schunkert H, Cupples LA, Sandhu MS, Ridker PM, Rader DJ, van Duijn CM, Peltonen L, Abecasis GR, Boehnke M, Kathiresan S. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 2010;466:707–713.
40. Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, Leonardson AS, Zink F, Zhu J, Carlson S, Helgason A, Walters GB, Gunnarsdottir S, Mouy M, Steinthorsdottir V, Eiriksdottir GH, Bjornsdottir G, Reynisdottir I, Gudbjartsson D, Helgadóttir A, Jonasdóttir A, Jonasdóttir A, Styrkarsdóttir U, Gretarsdóttir S, Magnusson KP, Stefansson H, Fossdal R, Kristjansson K, Gislason HG, Stefansson T, Leifsson BG, Thorsteinsdottir U, Lamb JR, Gulcher JR, Reitman ML, Kong A, Schadt EE, Stefansson K. Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature*. 2008;452:423–428.

Supplemental Material:

Co-segregation of aortic root atherosclerosis and intermediate lipid phenotypes on chromosomes 2 and 8 in an intercross of C57BL/6 and BALBc/ByJ LDLR^{-/-} mice

Ralph Burkhardt, Simon Sündermann, Doris Ludwig, Uta Ceglarek, Lesca M. Holdt, Joachim Thiery, Daniel Teupser

Supplemental Table I: Sterol content of semisynthetic diet used in the current study compared to chow

Diet	Brassicasterol mg/kg diet	Campesterol mg/kg diet	Sitosterol mg/kg diet	Cholesterol mg/kg diet
Semisynthetic	<1	13.9	74.7	174.3
Chow	12.5	106.3	402.0	Not detectable

Sterol content is given as mg of the respective sterol per 1kg of diet. Measurements were performed by LC-MS/MS as for plasma sterol levels. The cholesterol content of the semisynthetic diet (containing 0.02% cholesterol) was confirmed (0.2 g cholesterol / 1 kg diet).

Supplemental Table II: List of microsatellite markers and SNPs used for genotyping

marker	label	panel	C57 allele (bp)	BALB allele (bp)
D17MIT87	FAM	1	89.5	93.6
D6MIT86	FAM	1	133.7	121.9
D14MIT203	FAM	1	157.7	174.1
D7MIT253	HEX	1	89.1	87.1
D8MIT121	HEX	1	256.5	228.9
D11MIT350	NED	1	102.8	98.6
D3MIT63	NED	1	120.5	124.7
D9MIT239	NED	1	202.2	198.1
D13MIT76	FAM	2	108.7	100.6
D17MIT164	FAM	2	132.4	122.8
D2MIT74	FAM	2	159	161.2
D13MIT236	HEX	2	98.5	88.8
D2MIT518	HEX	2	111.8	125.3
D18MIT69	HEX	2	154	158.1
D14MIT7	NED	2	110.3	100.2
D16MIT86	NED	2	130.2	124.1
D8MIT348	NED	2	208.4	200.2
D18MIT185	FAM	3	100.9	96.7
D2MIT1	FAM	3	130	125.7
D4MIT178	FAM	3	154.1	178.7
D7MIT101	HEX	3	118.3	95.2
D17MIT123	HEX	3	136.3	142.1
D15MIT154	HEX	3	157.2	159.3
D11MIT360	NED	3	126.7	102.3
D4MIT181	NED	3	139.8	150
D16MIT189	NED	3	209.3	203.3
D1MIT136	FAM	4	103.4	109.5
DXMIT216	FAM	4	126.4	132.7
D12MIT164	FAM	4	148.2	152.7
D12MIT82	FAM	4	169.5	167.6
D8MIT124	HEX	4	132	137.9
D3MIT74	HEX	4	155.5	151.4
D10MIT233	NED	4	132.9	106
D5MIT31	NED	4	225	239.2
D2MIT409	FAM	5	105.7	99.2
D10MIT106	FAM	5	126.1	124.1
D13MIT88	FAM	5	172.3	184.1
D7MIT223	HEX	5	107.7	103.7
D7MIT152	HEX	5	130.4	126.5
D6MIT216	HEX	5	154.2	152.2
D4MIT68	NED	5	106.3	110.4
D13MIT139	NED	5	140.8	146.6
D2MIT66	NED	5	262.1	279.4
D6MIT274	FAM	6	117.6	96
D7MIT62	FAM	6	150.5	134.7

D12MIT34	FAM	6	175.5	190.3
D4MIT195	HEX	6	109.3	113.6
D19MIT71	HEX	6	136.89	150.63
D1MIT178	HEX	6	184.4	165.8
D10MIT271	FAM	7	119.1	99
D4MIT256	FAM	7	139.9	137.9
D15MIT176	FAM	7	156	158
D3MIT107	FAM	7	198.5	212
D16MIT103	HEX	7	114.4	110.4
D18MIT208	HEX	7	128.3	126.2
D10MIT80	HEX	7	157.1	142.6
D18MIT24	HEX	7	179.4	205.4
D7MIT248	NED	7	110.9	108
D16MIT139	NED	7	152.6	178.6
D9MIT151	FAM	8	121.5	110.5
D11MIT1	FAM	8	161	165
D5MIT201	HEX	8	115.3	111
D12MIT60	HEX	8	149.8	143.7
D7MIT267	HEX	8	200.6	185.9
DXMIT223	NED	8	108.7	112.7
D9MIT78	NED	8	131.4	127.1
D8MIT178	NED	8	154.8	165.2
D3MIT320	FAM	9	122.2	114.0
D1MIT296	FAM	9	146.6	138.9
D3MIT60	FAM	9	172.5	162.3
D1MIT155	FAM	9	255.8	219.3
D11MIT270	HEX	9	126.3	114.3
D5MIT249	HEX	9	144	145.8
D3MIT19	HEX	9	160	165.9
D15MIT67	HEX	9	194.3	192.3
D6MIT67	NED	9	156.1	160
D17MIT115	FAM	10	123.1	113.5
D10MIT20	FAM	10	236.8	224
D8MIT166	HEX	10	122.3	118.2
D2MIT7	HEX	10	148.3	146.3
D2MIT504	HEX	10	202.4	198.5
D9MIT259	NED	10	114.1	118.1
D12MIT134	NED	10	186.2	188
D5MIT73	FAM	11	117.2	119.2
D11MIT151	FAM	11	142.7	154.5
DXMIT124	FAM	11	180.9	177
D3MIT51	FAM	11	243.5	257.8
D14MIT267	HEX	11	116.8	118.9
D15MIT35	HEX	11	148	152.4
D12MIT4	HEX	11	209.2	198.7
D14MIT60	NED	11	137.8	114.1
D15MIT252	FAM	12	124.1	117.6
D14MIT244	FAM	12	148.8	144.1

D18MIT144	FAM	12	183	178.8
D6MIT159	HEX	12	119.2	144.1
D11MIT39	HEX	12	172.9	158.7
D6MIT15	HEX	12	257.7	200.1
D1MIT359	NED	12	123.7	116.6
D19MIT42	NED	12	179.7	185.6
D1MIT320	FAM	13	90	92
DXMIT68	FAM	13	128.8	120.9
D5MIT233	FAM	13	149.9	171.9
D13MIT191	HEX	13	122.9	127
DXMIT114	HEX	13	153.2	159.5
D13MIT78	HEX	13	231.7	212.1
D19MIT23	NED	13	200.3	189.6
D8MIT65	NED	13	242.9	290.6

additional SNP markers used for fine mapping:

rs13476554, rs13477072, rs13477139, rs13478802, rs13478865, rs13479643, rs13479723, rs13479792, rs13480021, rs27192030, rs27193625, rs4226262

Supplemental Table III: Primer and probe sequences for quantitative real-time TaqMan RT PCR:

Gene		Sequence	Acc. number
<i>Pla2r1</i>	5'-primer 3'-primer probe	5'- TCTGTGAGGAGTTTGGGGCTC -3' 5'- CTGCCTTTCCTGTGTCCAATTA -3' 5*- CCTCGCAAGCTTTGCCCATATAGAGGAAG -#3'	NM_008867
<i>Nr4a2</i> (<i>Nurr1</i>)	5'-primer 3'-primer probe	5'- TGCACCGTGCGCTTAAAGA -3' 5'- CGCGGCCTGTCAGCACTA -3' 5*- TGTTGCGCACTTGTGAGGGCTGCAAAGG -#3'	NM_001139509
<i>Beta-actin</i> (<i>Actb</i>)	5'-primer 3'-primer probe	5'- GAGAAGCTGTGCTATGTTGCTC -3' 5'- AGGAAGAGGATGCGGCA -3' 5*- AGACTTCGAGCAGGAGATGGCCA -#3'	NM_007393.1

FAM label; # TAMRA label

The PCR reaction was prepared in a final volume of 12.5 μ L of a reaction mixture containing 2.5 μ L of cDNA (diluted 1:15), 5 mM MgCl₂, 1.25 μ L 10 x AmpliTaq buffer A, 200 μ M dNTP (each), 0.03 U/ μ L AmpliTaq Gold TM (Applied Biosystems), 200 nM oligonucleotide probe (*beta-actin*, *Pla2r1* and *Nr4a2*, respectively), and 300 nM of each oligonucleotide primer. The cycling conditions were 95°C for 10 minutes and 40 two-step cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Analysis of the data was performed with the ABI PRISM sequence detection software. Standard curves were generated for each gene using a plasmid dilution series containing the target sequences.

Supplemental Table IV: Atherosclerosis and Intermediate Phenotypes in Parental B6.LDLR^{-/-} and BALB.LDLR^{-/-} F0 Mice, male versus female mice

	Balb/c			B6		
	Females	Males	P	Females	Males	P
N	17	17		16	15	
Atherosclerosis Aortic Root (μm ²)	7220 ±6237	5920 ±3104	NS	142302 ±60841	51919 ±30644	<0.0001
Length (cm)	8.9 ±2.2	9.2 ±2.5	<0.01	8.6 ±3.4	9.2 ±2.2	<0.0001
Weight (g)	20.6 ±5.6	28.1 ±2.8	<0.0001	21.4 ±8.4	28.0 ±7.6	<0.0001
Weight of Omental Fat (g)	0.43 ±0.13	0.62 ±0.09	<0.0001	0.43 ±0.17	0.62 ±0.23	<0.001
Weight of Perirenal Fat (g)	0.29 ±0.11	0.34 ±0.08	NS	0.27 ±0.11	0.36 ±0.21	NS
Weight of Epidym./Param. Fat (g)	0.33 ±0.14	0.64 ±0.19	<0.0001	0.30 ±0.13	0.78 ±0.45	<0.0001
Weight Total Fat (g)	1.05 ±0.27	1.61 ±0.52	<0.0001	1.00 ±0.30	1.76 ±0.8	<0.0001
Weight Kidney left (g)	0.17 ±0.03	0.20 ±0.06	<0.01	0.14 ±0.04	0.17 ±0.03	<0.0001
Weight Kidney right (g)	0.17 ±0.03	0.17 ±0.06	NS	0.13 ±0.03	0.17 ±0.02	<0.0001
Cholesterol (mg/dL)	323 ±142	334 ±116	NS	740 ±276	533 ±244	<0.01
VLDL-Cholesterol (mg/dL)	22.9 ±8.4	29.8 ±16.1	NS	191 ±80	73.1 ±47.2	<0.0001
LDL-Cholesterol (mg/dL)	236 ±57	209 ±74	NS	585 ±174	447 ±188	NS
HDL-Cholesterol (mg/dL)	65.0 ±9.7	109 ±19	<0.0001	34.8 ±13.8	70.1 ±27.7	<0.0001
Triglycerides (mg/dL)	145 ±76	200 ±88	<0.05	205 ±124	145 ±76	<0.05
VLDL-Triglycerides (mg/dL)	56.4 ±25.3	97.9 ±42.1	<0.01	100 ±52	77.9 ±46.9	NS
LDL-Triglycerides (mg/dL)	60.9 ±28.4	72.2 ±25.7	NS	64.2 ±26.4	59.7 ±22.2	NS
HDL-Triglycerides (mg/dL)	25.1 ±11.3	27.5 ±9.4	NS	20.0 ±10.1	19.4 ±8.2	NS
Free Brassicasterol (mg/L)	0.26 ±0.07	0.21 ±0.05	<0.05	0.67 ±0.27	0.34 ±0.19	<0.0001
Esterified Brassicasterol (mg/L)	0.99 ±0.24	0.62 ±0.17	<0.0001	3.3 ±1.3	1.2 ±0.71	<0.0001
Total Brassicasterol (mg/L)	1.3 ±0.3	0.83 ±0.22	<0.0001	4.0 ±1.5	1.6 ±0.88	<0.0001
Brassicasterol/Cholesterol	3.1x10 ⁻⁴ ±5.6x10 ⁻⁵	2.1x10 ⁻⁴ ±6.6x10 ⁻⁵	<0.0001	4.9x10 ⁻⁴ ±1.1x10 ⁻⁴	2.9x10 ⁻⁴ ±1.1x10 ⁻⁴	<0.0001
Free Sitosterol (mg/L)	1.1 ±0.44	0.95 ±0.32	NS	4.6 ±2.0	2.6 ±1.3	<0.001
Esterified Sitosterol (mg/L)	2.8 ±0.9	3.0 ±1.5	NS	7.0 ±2.3	4.9 ±2.2	<0.01
Total Sitosterol (mg/L)	3.9 ±1.3	4.0 ±1.7	NS	11.6 ±4.2	7.5 ±3.5	<0.01
Sitosterol/Cholesterol	1.0x10 ⁻³ ±6.0x10 ⁻⁴	1.0x10 ⁻³ ±3.0x10 ⁻⁴	NS	1.3x10 ⁻³ ±3.0x10 ⁻⁴	1.5x10 ⁻³ ±3.0x10 ⁻⁴	NS
Free Campesterol (mg/L)	4.3 ±1.4	3.2 ±1.1	<0.05	12.4 ±3.4	7.4 ±3.6	<0.0001
Esterified Campesterol (mg/L)	17.2 ±4.8	12.5 ±4.7	<0.01	43.1 ±12.7	23.2 ±11.1	<0.001
Total Campesterol (mg/L)	21.4 ±7.9	15.8 ±5.8	<0.01	55.4 ±16.2	30.6 ±14.7	<0.001
Campesterol/Cholesterol	5.0x10 ⁻³ ±1.0x10 ⁻³	4.0x10 ⁻³ ±1.0x10 ⁻³	<0.05	7.0x10 ⁻³ ±7.0x10 ⁻⁴	5.0x10 ⁻³ ±2.0x10 ⁻³	<0.01
Free Cholesterol (mg/L)	669 ±134	756 ±211	NS	1571 ±512	1212 ±485	<0.05
Esterified Cholesterol (mg/L)	3313 ±507	3429 ±763	NS	6178 ±937	5023 ±1569	<0.05
Total Cholesterol (mg/L)	3982 ±640	4185 ±972	NS	7749 ±1251	6236 ±2430	<0.05
Esterified Cholesterol/Cholesterol	0.83 ±0.008	0.82 ±0.01	<0.01	0.80 ±0.01	0.81 ±0.01	<0.01
Lanosterol (mg/L)	0.11 ±0.03	0.11 ±0.05	NS	0.84 ±0.79	0.26 ±0.17	<0.05
Lanosterol/Cholesterol	2.8x10 ⁻⁵ ±1.4x10 ⁻⁵	2.6x10 ⁻⁵ ±1.1x10 ⁻⁵	NS	1.0x10 ⁻⁴ ±1.0x10 ⁻⁴	4.4x10 ⁻⁵ ±2.0x10 ⁻⁵	<0.01
Interleukin-1α (pg/mL)	17.0 ±12.2	14.6 ±8.3	NS	19.1 ±14.3	10.5 ±10.0	NS
Interleukin-1β (pg/mL)	5.7 ±6.7	5.8 ±5.8	NS	35.2 ±62.0	27.0 ±46.8	NS
Interleukin-2 (pg/mL)	1.2 ±0.85	1.0 ±0.88	NS	2.1 ±1.7	2.6 ±3.2	NS
Interleukin-4 (pg/mL)	0.77 ±0.50	1.2 ±0.72	NS	1.8 ±1.4	0.28 ±0.17	NS
Interleukin-5 (pg/mL)	1.8 ±0.67	1.0 ±0.88	<0.05	2.2 ±2.0	2.3 ±2.2	NS
Interleukin-6 (pg/mL)	7.9 ±11.4	7.3 ±11.0	NS	11.3 ±8.3	7.1 ±6.8	NS
Interleukin-10 (pg/mL)	42.2 ±41.4	32.9 ±23.8	NS	59.8 ±50.8	35.0 ±25.6	NS
Interleukin-12(p40) (pg/mL)	111 ±27	130 ±38	NS	131 ±52	136 ±48	NS
Interleukin-12(p70) (pg/mL)	47.3 ±43.0	31.6 ±20.9	NS	77.0 ±88.7	45.2 ±45.1	NS
Interleukin-13 (pg/mL)	85.6 ±43.2	110 ±137	NS	432 ±477	101 ±47	<0.05
Interleukin-15 (pg/mL)	312 ±157	330 ±372	NS	556 ±459	273 ±164	NS
Interleukin-17 (pg/mL)	84.4 ±55.2	61.3 ±35.1	NS	97.3 ±65.0	65.4 ±38.4	NS
Interleukin-18 (pg/mL)	102 ±73	150 ±145	NS	510 ±816	226 ±362	NS
Interferon-γ (pg/mL)	64.0 ±62.7	41.5 ±21.9	NS	82.5 ±75.6	48.3 ±41.7	NS
KC (pg/mL)	12.5 ±4.5	18.8 ±9.5	<0.05	16.3 ±6.6	14.1 ±7.9	NS
MCP-1 (pg/mL)	41.6 ±25.7	30.4 ±13.0	NS	69.1 ±44.6	47.6 ±37.9	NS
RANTES (pg/mL)	16.2 ±13.5	19.6 ±13.0	NS	29.3 ±28.2	25.5 ±25.8	NS

TNF- α (pg/mL)	2576 \pm 1058	2771 \pm 880	NS	3110 \pm 1637	2809 \pm 1475	NS
M-CSF (pg/mL)	1629 \pm 241	1557 \pm 191	NS	1352 \pm 769	1645 \pm 749	NS
VEGF (pg/mL)	65.0 \pm 14.4	69.9 \pm 23.3	NS	65.0 \pm 35.4	64.8 \pm 24.3	NS
Glucose (mg/dL)	212 \pm 94	166 \pm 58	<0.05	260 \pm 125	248 \pm 86	NS
Total Protein (g/L)	46.8 \pm 16.7	49.2 \pm 12.1	NS	47.0 \pm 22.2	47.1 \pm 12.0	NS
GLDH (μ kat/L)	0.15 \pm 0.07	0.34 \pm 0.45	NS	0.16 \pm 0.08	0.36 \pm 0.65	NS
ALAT (μ kat/L)	0.45 \pm 0.26	0.51 \pm 0.17	NS	0.41 \pm 0.21	0.92 \pm 0.92	NS
ASAT(μ kat/L)	1.9 \pm 0.81	1.72 \pm 0.72	NS	2.0 \pm 0.99	2.3 \pm 2.0	NS
Cholinesterase (μ kat/L)	86.5 \pm 30.3	61.9 \pm 17.9	<0.01	92.5 \pm 43.6	66.7 \pm 21.3	<0.01
Coat Color	White	White		Black	Black	

Supplemental Table V: Genes mapping to mouse chromosome 2 between rs27192030 (34,401,208 bp) and rs13476554(67,080,320 bp), data obtained from: www.informatics.jax.org, accessed on 13 July 2010 (based on built: NCBI M37)

Chr	Start (bp)	End (bp)	Symbol	Name	Located in
					synthetic human QTL interval
2	34262291	34480469	Mapkap1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1	n
2	34531704	34610752	Gapvd1	GTPase activating protein and VPS9 domains 1	n
2	34627490	34632051	Hspa5	heat shock protein 5	n
2	34633076	34655432	Rabepk	Rab9 effector protein with kelch motifs	n
2	34660034	34681831	Fbxw2	F-box and WD-40 domain protein 2	n
2	34692699	34694817	Gm6422	predicted gene 6422	n
2	34707608	34726459	Psm5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5	n
2	34729916	34747652	D730039F16Rik	RIKEN cDNA D730039F16 gene	n
2	34749277	34769546	Phf19	PHD finger protein 19	n
2	34768391	34771534	Gm13448	predicted gene 13448	n
2	34798776	34817292	Traf1	TNF receptor-associated factor 1	n
2	34838851	34916958	Hc	hemolytic complement	n
2	34849493	34868966	Gm13449	predicted gene 13449	n
2	34939566	34957063	Al182371	expressed sequence Al182371	n
2	34965012	35034342	Cep110	centrosomal protein 110	n
2	35035725	35056640	Rab14	RAB14, member RAS oncogene family	n
2	35080055	35081774	Gm13605	predicted gene 13605	n
2	35135183	35163412	Gsn	gelsolin	n
2	35169506	35192496	Stom	stomatin	n
2	35209738	35223249	4930568D16Rik	RIKEN cDNA 4930568D16 gene	n
2	35231082	35252695	4930402F06Rik	RIKEN cDNA 4930402F06 gene	n
2	35255699	35318751	Ggta1	glycoprotein galactosyltransferase alpha 1, 3	n
2	35359051	35361610	Gm13447	predicted gene 13447	n
2	35410369	35414222	Gm13446	predicted gene 13446	n
2	35413786	35586514	Dab2ip	disabled homolog 2 (Drosophila) interacting protein	n
2	35606761	35835433	Ttl11	tubulin tyrosine ligase-like family, member 11	n
2	35674710	35678905	9030204H09Rik	RIKEN cDNA 9030204H09 gene	n
2	35699715	35702702	Gm10829	predicted gene 10829	n
2	35891846	35904926	Ndufa8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8	n
2	35904978	35935238	Morn5	MORN repeat containing 5	n
2	35937470	35960791	Lhx6	LIM homeobox protein 6	n
2	35971599	35992293	Rbm18	RNA binding motif protein 18	n
2	35991909	36046167	Mrrf	mitochondrial ribosome recycling factor	n
2	36057834	36068423	Gm13429	predicted gene 13429	n
2	36072297	36078454	Gm13431	predicted gene 13431	n
2	36085946	36107792	Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	n
2	36232298	36233218	Olfr338	olfactory receptor 338	n
2	36276920	36277849	Olfr339	olfactory receptor 339	n
2	36308107	36309045	Olfr340	olfactory receptor 340	n
2	36334707	36335648	Olfr341	olfactory receptor 341	n
2	36382934	36383872	Olfr342	olfactory receptor 342	n
2	36424120	36425049	Olfr344	olfactory receptor 344	n
2	36495561	36496496	Olfr345	olfactory receptor 345	n
2	36543524	36544453	Olfr346	olfactory receptor 346	n
2	36589843	36590781	Olfr347	olfactory receptor 347	n
2	36639796	36642988	Olfr348	olfactory receptor 348	n
2	36648758	36649696	Olfr50	olfactory receptor 50	n
2	36667669	36668610	Olfr3	olfactory receptor 3	n
2	36705568	36706506	Olfr350	olfactory receptor 350	n
2	36714934	36715866	Olfr351	olfactory receptor 351	n

2	36725088	36726035	Olfr352	olfactory receptor 352	n
2	36745431	36746366	Olfr353	olfactory receptor 353	n
2	36762468	36763421	Olfr354	olfactory receptor 354	n
2	36782700	36783632	Olfr355	olfactory receptor 355	n
2	36792641	36793588	Olfr356	olfactory receptor 356	n
2	36852332	36853258	Olfr357	olfactory receptor 357	n
2	36860140	36861132	Olfr358	olfactory receptor 358	n
2	36921266	36924780	Olfr360	olfactory receptor 360	n
2	36940298	36941266	Olfr361	olfactory receptor 361	n
2	36943808	36944684	Gm13434	predicted gene 13434	n
2	36960215	36961168	Olfr362	olfactory receptor 362	n
2	37056763	37057701	Olfr365	olfactory receptor 365	n
2	37075011	37075940	Olfr366	olfactory receptor 366	n
2	37187269	37188252	Olfr368	olfactory receptor 368	n
2	37205594	37214852	Pdcl	phosducin-like	n
2	37225589	37278423	Rc3h2	ring finger and CCH-type zinc finger domains 2	n
2	37255567	37255677	Snord90	small nucleolar RNA, C/D box 90	n
2	37281023	37298691	Zbtb6	zinc finger and BTB domain containing 6	n
2	37287688	37298641	Zbtb26	zinc finger and BTB domain containing 26	n
2	37298799	37421974	Rabgap1	RAB GTPase activating protein 1	n
2	37338748	37559379	Strbp	spermatid perinuclear RNA binding protein	n
2	37371852	37376123	Gpr21	G protein-coupled receptor 21	n
2	37631769	37654623	Crb2	crumbs homolog 2 (Drosophila)	n
2	37654511	38142910	Dennd1a	DENN/MADD domain containing 1A	n
2	38141775	38142811	Gm13556	predicted gene 13556	n
2	38194801	38225253	Lhx2	LIM homeobox protein 2	n
2	38202877	38203836	Gm3058	predicted gene 3058	n
2	38215100	38219500	Gm13584	predicted gene 13584	n
2	38279522	38311371	Gm13589	predicted gene 13589	n
2	38367163	38443561	Nek6	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 6	n
2	38443556	38499607	Psmb7	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7	n
2	38526678	38543171	Gpr144	G protein-coupled receptor 144	n
2	38528057	38532072	Gm13587	predicted gene 13587	n
2	38548176	38570061	Nr5a1	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1	n
2	38568196	38576158	4933433P16Rik	RIKEN cDNA 4933433P16 gene	n
2	38578890	38783208	Nr6a1	nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1	n
2	38678777	38707890	Gm13507	predicted gene 13507	n
2	38787498	38819273	Olfr362	olfactomedin-like 2A	n
2	38852233	38853778	Gm13496	predicted gene 13496	n
2	38852996	38861688	Wdr38	WD repeat domain 38	n
2	38857100	38861144	Rpl35	ribosomal protein L35	n
2	38863596	38871397	Arpc5l	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like	n
2	38871781	38921061	Golga1	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1	n
2	38921734	39046250	Scai	suppressor of cancer cell invasion	n
2	39049874	39081971	Ppp6c	protein phosphatase 6, catalytic subunit	n
2	40450768	42509118	Lrp1b	low density lipoprotein-related protein 1B (deleted in tumors)	n
2	41073913	41076698	Gm3937	predicted gene 3937	n
2	43051213	43052040	Gm3217	predicted gene 3217	n
2	43410849	43538235	Kynu	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	n
2	43604344	44251473	Arhgap15	Rho GTPase activating protein 15	n
2	43914758	43920844	A430092G05Rik	RIKEN cDNA A430092G05 gene	n
2	44419932	44783177	Gtdc1	glycosyltransferase-like domain containing 1	n
2	44842641	44972915	Zeb2	zinc finger E-box binding homeobox 2	n
2	44966658	44969607	Gm13476	predicted gene 13476	n
2	45212785	45259555	Gm13479	predicted gene 13479	n
2	45552125	45553967	1700019E08Rik	RIKEN cDNA 1700019E08 gene	n
2	45588977	45608831	Gm13465	predicted gene 13465	n

2	45603323	45607204	Gm13467	predicted gene 13467	n
2	46275055	46298230	Gm13470	predicted gene 13470	n
2	47918068	48312765	Gm13481	predicted gene 13481	n
2	48669629	48758789	Acvr2a	activin receptor IIA	n
2	48758344	48805797	Orc4l	origin recognition complex, subunit 4-like (<i>S. cerevisiae</i>)	n
2	48805030	49177804	Mbd5	methyl-CpG binding domain protein 5	n
2	49307006	49407468	Epc2	enhancer of polycomb homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	n
2	49474818	49630298	Kif5c	kinesin family member 5C	n
2	49643208	49804369	Lypd6b	LY6/PLAUR domain containing 6B	n
2	49661496	49668468	Gm13480	predicted gene 13480	n
2	49921982	50049084	Lypd6	LY6/PLAUR domain containing 6	n
2	50135401	50152321	Mmadhc	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblD type, with homocystinuria	n
2	50152330	50289487	Gm13483	predicted gene 13483	n
2	50403434	50407778	Gm13485	predicted gene 13485	n
2	50985958	51004631	Rnd3	Rho family GTPase 3	n
2	51097351	51151465	Gm13497	predicted gene 13497	n
2	51219092	51221019	Gm13499	predicted gene 13499	n
2	51276504	51294305	1700057H21Rik	RIKEN cDNA 1700057H21 gene	n
2	51483031	51483927	Tas2r134	taste receptor, type 2, member 134	n
2	51512486	51587529	Gm13490	predicted gene 13490	n
2	51779968	51790683	Rbm43	RNA binding motif protein 43	n
2	51804007	51829014	Nmi	N-myc (and STAT) interactor	n
2	51893529	51912206	Tnfrsf6	tumor necrosis factor alpha induced protein 6	n
2	51928362	51977903	Rif1	Rap1 interacting factor 1 homolog (yeast)	n
2	51992182	52194318	Neb	nebulin	n
2	52241436	52243780	Gm13522	predicted gene 13522	n
2	52253471	52280421	Arl5a	ADP-ribosylation factor-like 5A	n
2	52280532	52290405	A430018G15Rik	RIKEN cDNA A430018G15 gene	n
2	52283845	52532350	Cacnb4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	y
2	52475252	52476149	Gm13540	predicted gene 13540	y
2	52547183	52601315	Stam2	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2	y
2	52716894	52992838	Fmn12	formin-like 2	y
2	52993738	53050318	Prpf40a	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (yeast)	y
2	53050760	53078254	Arl6ip6	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 6	y
2	53936504	53937963	Rprm	reprimin, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate	y
2	54288643	54298830	Gm4086	predicted gene 4086	y
2	54288728	54970720	Galnt13	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13	y
2	55264201	55285846	Gm14033	predicted gene 14033	y
2	55288381	55450556	Kcnj3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	y
2	56959241	56976552	2210008N01Rik	RIKEN cDNA 2210008N01 gene	y
2	56959241	56976414	Nr4a2	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	y
2	56979890	57034165	BB557941	expressed sequence BB557941	y
2	57034242	57040668	4930555B11Rik	RIKEN cDNA 4930555B11 gene	y
2	57088638	57090919	A930012O16Rik	RIKEN cDNA A930012O16 gene	y
2	57090046	57223130	Gpd2	glycerol phosphate dehydrogenase 2, mitochondrial	y
2	57850295	57898271	Galnt5	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	y
2	57897524	57905275	Ernm	ermin, ERM-like protein	y
2	57981548	58047943	Cytip	cytohesin 1 interacting protein	y
2	58016412	58029474	Gm13546	predicted gene 13546	y
2	58119864	58210306	Acvr1c	activin A receptor, type IC	y
2	58129190	58139313	Gm13544	predicted gene 13544	y
2	58241055	58419568	Acvr1	activin A receptor, type 1	y
2	58419709	58645382	Upp2	uridine phosphorylase 2	y
2	58558180	58587807	Gm13558	predicted gene 13558	y
2	58674108	58998740	Ccdc148	coiled-coil domain containing 148	y
2	58759370	58760029	Gm11099	predicted gene 11099	y
2	58998907	59193265	Pkp4	plakophilin 4	y

2	59220559	59225528	5330411J11Rik	RIKEN cDNA 5330411J11 gene	y
2	59322710	59343077	Dapl1	death associated protein-like 1	y
2	59450099	59683774	Tanc1	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1	y
2	59690421	59720648	Wdsub1	WD repeat, SAM and U-box domain containing 1	y
2	59737420	60047896	Baz2b	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	y
2	59875198	59876894	Gm13572	predicted gene 13572	y
2	59963153	59963876	Gm13620	predicted gene 13620	y
2	60047944	60088733	March7	membrane-associated ring finger (C3HC4) 7	y
2	60090050	60122545	Cd302	CD302 antigen	y
2	60130160	60221360	Ly75	lymphocyte antigen 75	y
2	60176245	60209291	Gm13571	predicted gene 13571	y
2	60249582	60250636	Gm13580	predicted gene 13580	y
2	60255600	60391365	Pla2r1	phospholipase A2 receptor 1	y
2	60388814	60391980	Gm13583	predicted gene 13583	y
2	60436349	60560700	Itgb6	integrin beta 6	y
2	60588250	60801249	Rbms1	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	y
2	60802433	60813208	Gm13582	predicted gene 13582	y
2	61416642	61492228	Tank	TRAF family member-associated Nf-kappa B activator	y
2	61549751	61638433	Psmd14	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	y
2	61640987	61652171	Tbr1	T-box brain gene 1	y
2	61884519	62164787	Slc4a10	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter-like, member 10	y
2	62168130	62250288	Dpp4	dipeptidylpeptidase 4	y
2	62195128	62308970	Gm13561	predicted gene 13561	y
2	62274937	62279199	Gm13565	predicted gene 13565	y
2	62290993	62294705	Gm13564	predicted gene 13564	y
2	62312587	62321707	Gcg	glucagon	y
2	62339000	62412132	Fap	fibroblast activation protein	y
2	62433855	62484268	Ifih1	interferon induced with helicase C domain 1	y
2	62502342	62532166	Gca	grancalcin	y
2	62531471	63022344	Kcnh7	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 7	y
2	62647244	62648755	Gm13569	predicted gene 13569	y
2	63365765	63386534	Gm8541	predicted gene 8541	y
2	63809564	63936095	Fign	fidgetin	y
2	64220659	64231917	Gm13575	predicted gene 13575	y
2	64750533	64863044	Grb14	growth factor receptor bound protein 14	n
2	64926407	65077460	Cobl1	Cobl-like 1	n
2	65076813	65077732	Gm13594	predicted gene 13594	n
2	65154487	65202091	Slc38a11	solute carrier family 38, member 11	n
2	65296320	65405684	Scn3a	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	n
2	65347322	65350662	Gm13595	predicted gene 13595	n
2	65458914	65605504	Scn2a1	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1	n
2	65683824	65869603	Csmp3	cysteine-serine-rich nuclear protein 3	n
2	65690465	65698676	Gm13619	predicted gene 13619	n
2	65782356	65792127	Gm13617	predicted gene 13617	n
2	65920823	65963051	Galnt3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3	n
2	66022384	66094674	Ttc21b	tetratricopeptide repeat domain 21B	n
2	66025893	66030870	Gm13618	predicted gene 13618	n
2	66108838	66278897	Scn1a	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	n
2	66247551	66259645	Gm13630	predicted gene 13630	n
2	66250259	66256300	Gm2262	predicted gene 2262	n
2	66278937	66384083	Gm13629	predicted gene 13629	n
2	66318137	66473009	Scn9a	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	n
2	66511482	66622971	Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	n
2	66995703	67032792	Gm13598	predicted gene 13598	n
2	67011891	67023007	Gm1322	predicted gene 1322	n

Supplemental Table VI: Genes mapping to mouse chromosome 8 between rs13479643 (23,069,722 bp) and D8Mit178 (73,569,499 bp), data obtained from: www.informatics.jax.org, accessed on 15 October 2010 (based on built: NCBI M37)

Chr	Start (bp)	End (bp)	Symbol	Name
8	23069186	23074775	C86695	expressed sequence C86695
8	23080247	23084513	Ccdc70	coiled-coil domain containing 70
8	23103257	23170777	Atp7b	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
8	23171193	23182099	Alg11	asparagine-linked glycosylation 11 homolog (yeast, alpha-1,2-mannosyltransferase)
8	23184088	23235525	Nek5	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 5
8	23238755	23276907	Nek3	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 3
8	23278921	23296291	Ckap2	cytoskeleton associated protein 2
8	23303281	23331315	Vps36	vacuolar protein sorting 36 (yeast)
8	23337785	23371806	Thsd1	thrombospondin, type I, domain 1
8	23393913	23481890	Tpte	transmembrane phosphatase with tensin homology
8	23486479	23509025	Slc25a15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier ornithine transporter), member 15
8	23521913	23539945	Mrps31	mitochondrial ribosomal protein S31
8	23573095	23587140	Al316807	expressed sequence Al316807
8	23587260	23680079	Slc20a2	solute carrier family 20, member 2
8	23687573	23704230	Vdac3	voltage-dependent anion channel 3
8	23734515	23738008	Dkk4	dickkopf homolog 4 (Xenopus laevis)
8	23738737	23763886	Polb	polymerase (DNA directed), beta
8	23769684	23817061	Ikbkb	inhibitor of kappaB kinase beta
8	23868240	23893316	Plat	plasminogen activator, tissue
8	23897827	23916099	Ap3m2	adaptor-related protein complex 3, mu 2 subunit
8	23918747	23919204	1700041G16Rik	RIKEN cDNA 1700041G16 gene
8	23970007	24053731	Myst3	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3
8	24085294	24260969	Ank1	ankyrin 1, erythroid
8	24263743	24269420	Nkx6-3	NK6 homeobox 3
8	24284207	24318833	Agpat6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (lysophosphatidic acid acyltransferase, zeta)
8	24337097	24348131	Gins4	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)
8	24351825	24367546	Golga7	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 7
8	24367211	24368488	4930518F22Rik	RIKEN cDNA 4930518F22 gene
8	24521974	24560104	Sfrp1	secreted frizzled-related protein 1
8	24746491	25267057	Zmat4	zinc finger, matrin type 4
8	24778947	24780201	Gm3049	predicted gene 3049
8	25284376	25296040	A730045E13Rik	RIKEN cDNA A730045E13 gene
8	25549048	25549368	1810011O10Rik	RIKEN cDNA 1810011O10 gene
8	25642366	25686805	Ido2	indoleamine 2,3-dioxygenase 2
8	25694608	25707481	Ido1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
8	25712718	25785227	Adam18	a disintegrin and metallopeptidase domain 18
8	25787706	25836297	Adam3	a disintegrin and metallopeptidase domain 3 (cyritestin)
8	25837565	25934841	Adam5	a disintegrin and metallopeptidase domain 5
8	25946615	26059276	Adam32	a disintegrin and metallopeptidase domain 32
8	26060097	26127266	Adam9	a disintegrin and metallopeptidase domain 9 (meltrin gamma)
8	26127752	26133731	Tm2d2	TM2 domain containing 2
8	26135400	26149434	Htra4	Htra serine peptidase 4
8	26149616	26212666	Plekha2	pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2
8	26212992	26220134	Gm3819	predicted gene 3819
8	26265024	26311921	Tacc1	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1

8	26564341	26565627	Gm3085	predicted gene 3085
8	26624126	26685253	Fgfr1	fibroblast growth factor receptor 1
8	26702132	26707968	Letm2	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2
8	26707484	26708461	D830025C05Rik	RIKEN cDNA D830025C05 gene
8	26712073	26830139	Whsc1l1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human)
8	26830533	26835359	Ppapdc1b	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1B
8	26835821	26864672	Ddhd2	DDHD domain containing 2
8	26877669	26895674	Bag4	BCL2-associated athanogene 4
8	26895780	26913003	Lsm1	LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
8	26918946	26925195	Star	steroidogenic acute regulatory protein
8	26926663	26958166	Ash2l	ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)
8	26960095	27048405	Kcnu1	potassium channel, subfamily U, member 1
8	27054931	27087216	Hgsnat	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
8	27091076	27104593	4930444A02Rik	RIKEN cDNA 4930444A02 gene
8	27109446	27126070	Fnta	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
8	27131893	27229696	Hook3	hook homolog 3 (Drosophila)
8	27193081	27213166	1700047A11Rik	RIKEN cDNA 1700047A11 gene
8	27229840	27254343	Rnf170	ring finger protein 170
8	27268684	27273412	Thap1	THAP domain containing, apoptosis associated protein 1
8	28087826	28091938	Zfp703	zinc finger protein 703
8	28134331	28149896	Erlin2	ER lipid raft associated 2
8	28153075	28165038	Prosc	proline synthetase co-transcribed
8	28196313	28233890	Gpr124	G protein-coupled receptor 124
8	28234304	28239104	Brf2	BRF2, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor, BRF1-like
8	28249245	28285120	Rab11fip1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)
8	28307932	28313019	Got1l1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1-like 1
8	28336248	28340060	Adrb3	adrenergic receptor, beta 3
8	28370850	28385985	Eif4ebp1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
8	28454866	28459659	Tex24	testis expressed gene 24
8	28479183	28510201	Chrb3	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 3
8	28513686	28524356	Chrna6	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 6
8	28558142	28574584	Poteg	POTE ankyrin domain family, member G
8	28714823	28730924	Gm1698	predicted gene 1698
8	29703977	29704785	Gm3920	predicted gene 3920
8	29762522	30329810	Unc5d	unc-5 homolog D (C. elegans)
8	31292334	31293997	Gm6853	predicted gene 6853
8	32199943	32207519	Dusp26	dual specificity phosphatase 26 (putative)
8	32222292	32241954	Rnf122	ring finger protein 122
8	32260787	32272345	BC019943	cDNA sequence BC019943
8	32269940	32279196	Mak16	MAK16 homolog (S. cerevisiae)
8	32297803	32372210	Fut10	fucosyltransferase 10
8	32478221	32492914	7420700N18Rik	RIKEN cDNA 7420700N18 gene
8	32901974	32906701	Gm3280	predicted gene 3280
8	32928500	33028675	Nrg1	neuregulin 1
8	33187639	33194346	2010007E15Rik	RIKEN cDNA 2010007E15 gene
8	33262365	33292319	Gm8179	predicted gene 8179
8	33587355	33587801	Gm5908	predicted gene 5908
8	33998977	34060498	Gm3985	predicted gene 3985
8	34125161	34182427	Gm6876	predicted gene 6876
8	34346172	34495969	Wrn	Werner syndrome homolog (human)
8	34496797	34497860	Purg	purine-rich element binding protein G

8	34539268	34542471	5930422O12Rik	RIKEN cDNA 5930422O12 gene
8	34627210	34696054	Tex15	testis expressed gene 15
8	34710097	34730266	Ppp2cb	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, beta isoform
8	34731481	34752431	Ubxn8	UBX domain protein 8
8	34762995	34808635	Gsr	glutathione reductase
8	34841021	34841344	1700104B16Rik	RIKEN cDNA 1700104B16 gene
8	34842574	34887041	Gtf2e2	general transcription factor II E, polypeptide 2 (beta subunit)
8	34893116	35040313	Rbpms	RNA binding protein gene with multiple splicing
8	35028904	35032416	Gm4021	predicted gene 4021
8	35112316	35120100	Gm9951	predicted gene 9951
8	35153474	35171850	Dctn6	dynactin 6
8	35186798	35187772	Mboat4	membrane bound O-acyltransferase domain containing 4
8	35198626	35210087	Leprotl1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
8	35217642	35233738	Tmem66	transmembrane protein 66
8	35870351	35882948	Dusp4	dual specificity phosphatase 4
8	35872588	35873463	Gm9648	predicted gene 9648
8	35892233	36028744	Tnks	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase
8	36438795	36451178	Ppp1r3b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B
8	36529141	36558535	Eri1	exoribonuclease 1
8	36650852	36742503	Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1
8	36762110	36830423	Gm3413	predicted gene 3413
8	36830688	36881101	Gm501	predicted gene 501
8	36888496	36889386	Cldn23	claudin 23
8	37088807	37089190	Gm10063	predicted gene 10063
8	37157882	37210841	D8Erd82e	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 82, expressed
8	37279118	37312570	Lonrf1	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1
8	37520602	37577374	6430573F11Rik	RIKEN cDNA 6430573F11 gene
8	37630805	37796108	Dlc1	deleted in liver cancer 1
8	37657982	37659855	Gm4092	predicted gene 4092
8	37998638	38015490	A730069N07Rik	RIKEN cDNA A730069N07 gene
8	38056636	38057788	Al429214	expressed sequence Al429214
8	38153024	38153233	Gm10683	predicted gene 10683
8	38585352	39724562	Sgcz	sarcoglycan zeta
8	40068921	40193871	Tusc3	tumor suppressor candidate 3
8	40383334	40453622	Gm6213	predicted gene 6213
8	40688806	40728032	Msr1	macrophage scavenger receptor 1
8	40816503	40852499	Gm2033	predicted gene 2033
8	41018100	41018357	Gm10682	predicted gene 10682
8	41364520	41393685	Fgf20	fibroblast growth factor 20
8	41392812	41471662	Efha2	EF-hand domain family, member A2
8	41509169	41595620	Zdhc2	zinc finger, DHHC domain containing 2
8	41577894	41601201	Cnot7	CCR4-NOT transcription complex, subunit 7
8	41597137	41636488	Vps37a	vacuolar protein sorting 37A (yeast)
8	41636455	41720110	Mtmr7	myotubularin related protein 7
8	41735905	41745741	Gm2085	predicted gene 2085
8	41760448	41767553	Adam24	a disintegrin and metallopeptidase domain 24 (testase 1)
8	41837562	41841529	Adam25	a disintegrin and metallopeptidase domain 25 (testase 2)
8	41878627	41882657	4930529F22Rik	RIKEN cDNA 4930529F22 gene
8	41908363	41912215	Adam39	a disintegrin and metallopeptidase domain 39
8	41947750	42007662	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2
8	42011566	42076139	Pdgfrl	platelet-derived growth factor receptor-like

8	42075555	42075896	Gm9868	predicted gene 9868
8	42076272	42219080	Mtus1	mitochondrial tumor suppressor 1
8	42276788	42300510	Fgl1	fibrinogen-like protein 1
8	42325127	42417695	Pcm1	pericentriolar material 1
8	42425551	42460127	Asah1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1
8	42482819	42502428	Frg1	FSHD region gene 1
8	42742859	42744035	Gm1815	predicted gene 1815
8	43166814	43168463	Zfp353	zinc finger protein 353
8	44215161	44226840	Triml1	tripartite motif family-like 1
8	44380422	44392290	Zfp42	zinc finger protein 42
8	44605218	44607317	Adam26b	a disintegrin and metallopeptidase domain 26B
8	44653627	44662020	Adam26a	a disintegrin and metallopeptidase domain 26A (testase 3)
8	44710329	44712539	Gm5346	predicted gene 5346
8	44735663	44750919	Adam34	a disintegrin and metallopeptidase domain 34
8	44759174	44761315	Gm5347	predicted gene 5347
8	45806143	46020493	Gm2278	predicted gene 2278
8	46035568	46137611	Fat1	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)
8	46105912	46107737	Gm2366	predicted gene 2366
8	46146056	46150772	AY512931	cDNA sequence AY512931
8	46154491	46173710	Mtnr1a	melatonin receptor 1A
8	46245846	46250499	Gm6329	predicted gene 6329
8	46326524	46347385	F11	coagulation factor XI
8	46354796	46393820	Klkb1	kallikrein B, plasma 1
8	46391155	46418570	Cyp4v3	cytochrome P450, family 4, subfamily v, polypeptide 3
8	46422071	46467645	Fam149a	family with sequence similarity 149, member A
8	46481019	46495893	Tlr3	toll-like receptor 3
8	46593148	46913259	Sorbs2	sorbin and SH3 domain containing 2
8	46970815	47004769	Pdlim3	PDZ and LIM domain 3
8	47020003	47029499	Ccdc110	coiled-coil domain containing 110
8	47038960	47060606	1700029J07Rik	RIKEN cDNA 1700029J07 gene
8	47060882	47082312	Ufsp2	UFM1-specific peptidase 2
8	47082256	47085221	Ankrd37	ankyrin repeat domain 37
8	47084657	47114831	Lrp2bp	Lrp2 binding protein
8	47118620	47237511	Snx25	sorting nexin 25
8	47237125	47280944	4933411K20Rik	RIKEN cDNA 4933411K20 gene
8	47292151	47296638	Slc25a4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 4
8	47377404	47380025	Helt	Hey-like transcription factor (zebrafish)
8	47556395	47621405	Acs1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
8	47637409	47665361	Mlf1ip	myeloid leukemia factor 1 interacting protein
8	47660933	47702566	Ccdc111	coiled-coil domain containing 111
8	47702803	47724071	Casp3	caspase 3
8	47825129	47932812	Irf2	interferon regulatory factor 2
8	48072279	48180249	Enpp6	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 6
8	48271310	48437702	Stox2	storkhead box 2
8	48498483	48500713	Gm10083	predicted gene 10083
8	48575469	48618824	D030016E14Rik	RIKEN cDNA D030016E14 gene
8	48619023	48636081	Rwdd4a	RWD domain containing 4A
8	48752532	48760910	Ing2	inhibitor of growth family, member 2
8	48760745	48762409	AA386476	expressed sequence AA386476
8	48794802	48799253	Cdkn2aip	CDKN2A interacting protein
8	48907497	48908159	Cldn24	claudin 24

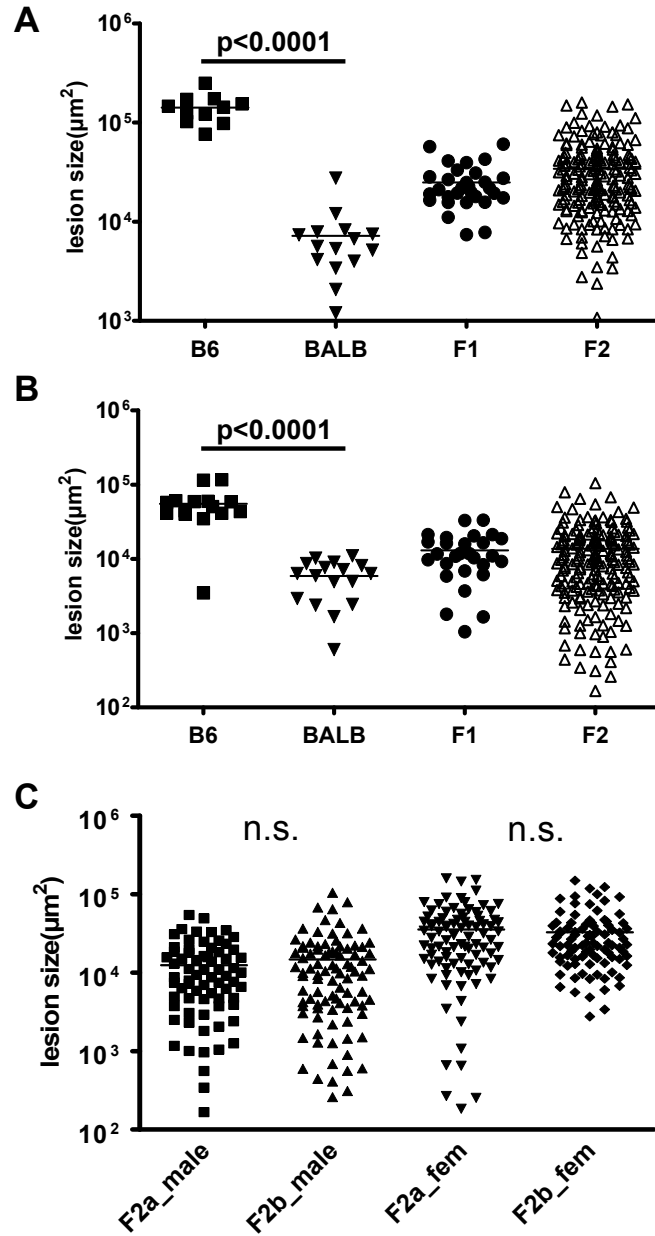
8	48909883	48910545	Cldn22	claudin 22
8	48912949	49075905	Wwc2	WW, C2 and coiled-coil domain containing 2
8	49195539	49227017	Dctd	dCMP deaminase
8	49313036	49760044	Odz3	odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)
8	49927349	49929200	2900073C17Rik	RIKEN cDNA 2900073C17 gene
8	50117720	50119105	Gm2465	predicted gene 2465
8	50143506	50144303	Gm10675	predicted gene 10675
8	50267092	50267264	Gm9842	predicted gene 9842
8	50271272	50271628	Hpvc1	human papillomavirus 18 E5 central sequence motif gene 1
8	50456240	50606449	4930555F03Rik	RIKEN cDNA 4930555F03 gene
8	51122681	51123151	Gm8665	predicted gene 8665
8	51482992	51501443	Gm2516	predicted gene 2516
8	53281117	53282553	Gm9892	predicted gene 9892
8	54597080	54608776	Aga	aspartylglucosaminidase
8	54672221	54724419	Neil3	nei like 3 (E. coli)
8	55162886	55271808	Vegfc	vascular endothelial growth factor C
8	55605787	55615351	Spcs3	signal peptidase complex subunit 3 homolog (S. cerevisiae)
8	55635684	55673189	Asb5	ankyrin repeat and SOCs box-containing 5
8	55686134	55695451	Spata4	spermatogenesis associated 4
8	55714966	55809827	Wdr17	WD repeat domain 17
8	56040196	56146224	Gpm6a	glycoprotein m6a
8	56197122	56198699	Gm2745	predicted gene 2745
8	56200420	56201997	Gm2749	predicted gene 2749
8	56203724	56205648	Gm5927	predicted gene 5927
8	56208108	56208614	Gm10674	predicted gene 10674
8	57910790	57912361	Gm392	predicted gene 392
8	57977384	57978904	Gm1153	predicted gene 1153
8	57980773	57982293	Gm7349	predicted gene 7349
8	57984192	57985712	Gm7354	predicted gene 7354
8	57990965	57992485	Gm7360	predicted gene 7360
8	57996505	57998072	Gm7373	predicted gene 7373
8	58017542	58019101	Gm7385	predicted gene 7385
8	58349709	58385745	Adam29	a disintegrin and metallopeptidase domain 29
8	58419622	58604149	Glra3	glycine receptor, alpha 3 subunit
8	58773382	58799002	Hpgd	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (NAD)
8	59010319	59029844	BC088983	cDNA sequence BC088983
8	59029887	59071190	Fbxo8	F-box protein 8
8	59029904	59030212	Gm16993	predicted gene, 16993
8	59784124	59799751	Gm2818	predicted gene 2818
8	59800701	59802661	Hand2	heart and neural crest derivatives expressed transcript 2
8	59934852	59956383	Scrg1	scrapie responsive gene 1
8	59961504	59966657	Sap30	sin3 associated polypeptide
8	59990704	59993291	Hmgb2	high mobility group box 2
8	60002625	60131829	Galnt7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7
8	60278749	60281705	Gm2921	predicted gene 2921
8	60906291	61390424	Galnt6	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 6
8	61390552	61393095	BC030500	cDNA sequence BC030500
8	62908644	62982026	Gm10283	predicted gene 10283
8	62984921	63024474	Aadat	aminoadipate aminotransferase
8	63111624	63155526	Mfap3l	microfibrillar-associated protein 3-like
8	63369215	63386377	2700029M09Rik	RIKEN cDNA 2700029M09 gene

8	63389186	63462097	Clcn3	chloride channel 3
8	63462234	63464705	B230317F23Rik	RIKEN cDNA B230317F23 gene
8	63471992	63610143	Nek1	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 1
8	63702968	63874869	Sh3rf1	SH3 domain containing ring finger 1
8	63966531	63982279	Cbr4	carbonyl reductase 4
8	63992043	64381466	Palld	palladin, cytoskeletal associated protein
8	64141001	64142611	Gm3014	predicted gene 3014
8	64150213	64152193	Gm11040	predicted gene 11040
8	64406884	64516498	Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
8	64536312	64601890	Anxa10	annexin A10
8	65429806	65835900	Spock3	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 3
8	66403491	66430967	Gm4975	predicted gene 4975
8	66493567	66684790	Tll1	tolloid-like
8	67071355	67171837	Cpe	carboxypeptidase E
8	67196936	67212589	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like
8	67218659	67258662	Klhl2	kelch-like 2, Mayven (Drosophila)
8	67349868	67352060	Gm11039	predicted gene 11039
8	67471114	67492933	Tmem192	transmembrane protein 192
8	67505550	67511545	Trim75	tripartite motif-containing 75
8	67523952	67542476	Trim60	tripartite motif-containing 60
8	67536888	67542472	Trim61	tripartite motif-containing 61
8	67538755	67561235	Gm10664	predicted gene 10664
8	67598932	67601379	Gm10663	predicted gene 10663
8	67609516	67653311	BC030870	cDNA sequence BC030870
8	68141799	68995536	March1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1
8	68997565	68997801	Gm10661	predicted gene 10661
8	68998229	69010429	1810029B16Rik	RIKEN cDNA 1810029B16 gene
8	69035655	69037656	Tktl2	transketolase-like 2
8	69203866	69211993	Npy5r	neuropeptide Y receptor Y5
8	69221321	69230691	Npy1r	neuropeptide Y receptor Y1
8	69384116	69414463	Naf1	nuclear assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)
8	69876003	69888903	Gm10660	predicted gene 10660
8	70014657	70016003	Nat1	N-acetyl transferase 1
8	70018847	70026469	Nat2	N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)
8	70047753	70072526	Nat3	N-acetyltransferase 3
8	70207581	70209939	Gm11038	predicted gene 11038
8	70212988	70586185	Psd3	pleckstrin and Sec7 domain containing 3
8	70800466	70871593	Sh2d4a	SH2 domain containing 4A
8	70880680	71259045	Csgalnact1	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1
8	71317828	71353309	Ints10	integrator complex subunit 10
8	71404454	71430831	Lpl	lipoprotein lipase
8	71561610	71613134	Slc18a1	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1
8	71612545	71637610	Atp6v1b2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit B2
8	71659402	71664852	Lzts1	leucine zipper, putative tumor suppressor 1
8	71706085	71710284	Gm7677	predicted gene 7677
8	71750242	71752879	D10627	cDNA sequence D10627
8	71794979	71827274	D130040H23Rik	RIKEN cDNA D130040H23 gene
8	71896044	71897282	Gm10033	predicted gene 10033
8	71897427	71897813	Gm10311	predicted gene 10311
8	71944330	71977295	Gm9495	predicted gene 9495
8	71997408	72046711	Gm7697	predicted gene 7697

8	72104487	72109147	Gm9608	predicted gene 9608
8	72134756	72149447	Zfp868	zinc finger protein 868
8	72182097	72200445	Gm7187	predicted gene 7187
8	72229039	72240801	Zfp869	zinc finger protein 869
8	72265538	72315077	Zfp866	zinc finger protein 866
8	72315149	72331637	Atp13a1	ATPase type 13A1
8	72332578	72345769	Gmip	Gem-interacting protein
8	72346464	72355001	Lpar2	lysophosphatidic acid receptor 2
8	72356523	72397062	Pbx4	pre-B-cell leukemia homeobox 4
8	72404268	72411586	Cilp2	cartilage intermediate layer protein 2
8	72411687	72414866	Yjefn3	YjeF N-terminal domain containing 3
8	72418087	72425547	Ndufa13	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13
8	72426114	72427417	Tssk6	testis-specific serine kinase 6
8	72432369	72520263	Gatad2a	GATA zinc finger domain containing 2A
8	72542481	72566633	9130404D08Rik	RIKEN cDNA 9130404D08 gene
8	72566712	72595852	Sugp1	SURP and G patch domain containing 1
8	72596823	72603965	Tm6sf2	transmembrane 6 superfamily member 2
8	72607428	72614596	Hapln4	hyaluronan and proteoglycan link protein 4
8	72616984	72644772	Ncan	neurocan
8	72655246	72657638	Nr2c2ap	nuclear receptor 2C2-associated protein
8	72657169	72663023	Rfxank	regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein
8	72663398	72671218	2310045N01Rik	RIKEN cDNA 2310045N01 gene
8	72663610	72691387	Mef2b	myocyte enhancer factor 2B
8	72696255	72707580	Tmem161a	transmembrane protein 161A
8	72708239	72736204	Slc25a42	solute carrier family 25, member 42
8	72744071	72758365	Armc6	armadillo repeat containing 6
8	72758125	72803814	Sugp2	SURP and G patch domain containing 2
8	72806726	72818260	Homer3	homer homolog 3 (Drosophila)
8	72816765	72826388	Ddx49	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 49
8	72826417	72836892	Cope	coatamer protein complex, subunit epsilon
8	72839686	72855486	Lass1	LAG1 homolog, ceramide synthase 1
8	72839692	72855472	Gdf1	growth differentiation factor 1
8	72855432	72877178	Upf1	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)
8	72897457	72905964	Comp	cartilage oligomeric matrix protein
8	72906254	72963478	Crtc1	CREB regulated transcription coactivator 1
8	72974127	73000842	Klhl26	kelch-like 26 (Drosophila)
8	73007775	73011257	Tmem59l	transmembrane protein 59-like
8	73017057	73027980	Crif1	cytokine receptor-like factor 1
8	73028191	73030651	2810428I15Rik	RIKEN cDNA 2810428I15 gene
8	73032162	73034700	Uba52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1
8	73032171	73051855	2810422J05Rik	RIKEN cDNA 2810422J05 gene
8	73051623	73059227	Fkbp8	FK506 binding protein 8
8	73063604	73116755	Ell	elongation factor RNA polymerase II
8	73118389	73121187	Isyna1	myo-inositol 1-phosphate synthase A1
8	73121389	73132172	Ssbp4	single stranded DNA binding protein 4
8	73140743	73144749	Lrrc25	leucine rich repeat containing 25
8	73153292	73156355	Gdf15	growth differentiation factor 15
8	73173784	73183567	Pgpep1	pyroglutamyl-peptidase I
8	73197147	73202651	Lsm4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
8	73222848	73224514	Jund	Jun proto-oncogene related gene d
8	73223437	73223979	Gm11175	predicted gene 11175

8	73232059	73241549	Gm16486	predicted gene 16486
8	73242442	73246534	Gm3336	predicted gene 3336
8	73247619	73275085	Pde4c	phosphodiesterase 4C, cAMP specific
8	73278578	73282576	Rab3a	RAB3A, member RAS oncogene family
8	73282548	73284820	Mpv17l2	MPV17 mitochondrial membrane protein-like 2
8	73286673	73290562	Ifi30	interferon gamma inducible protein 30
8	73292075	73300612	Pik3r2	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 2 (p85 beta)
8	73297663	73298323	Gm3598	predicted gene 3598
8	73303103	73320845	Mast3	microtubule associated serine/threonine kinase 3
8	73332393	73345321	Il12rb1	interleukin 12 receptor, beta 1
8	73359054	73363433	Arrdc2	arrestin domain containing 2
8	73367057	73379484	Kcnn1	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 1
8	73387026	73389327	Gm3624	predicted gene 3624
8	73387026	73389327	A230052G05Rik	RIKEN cDNA A230052G05 gene
8	73392127	73397389	Ccdc124	coiled-coil domain containing 124
8	73406788	73416656	Slc5a5	solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), member 5
8	73419278	73421313	Rpl18a	ribosomal protein L18A
8	73429886	73441424	Mtap1s	microtubule-associated protein 1S
8	73455304	73456936	Gm10654	predicted gene 10654

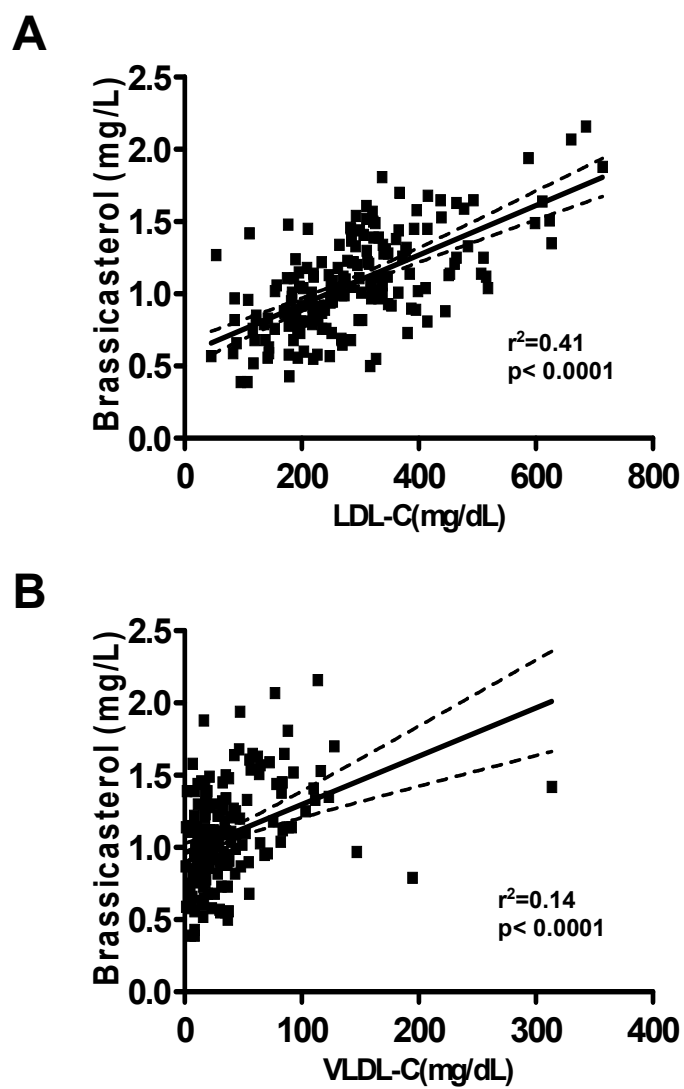
Supplemental Figure I:



Supplemental Figure I: Atherosclerotic lesion size in parental strains, F1 and F2 generations.

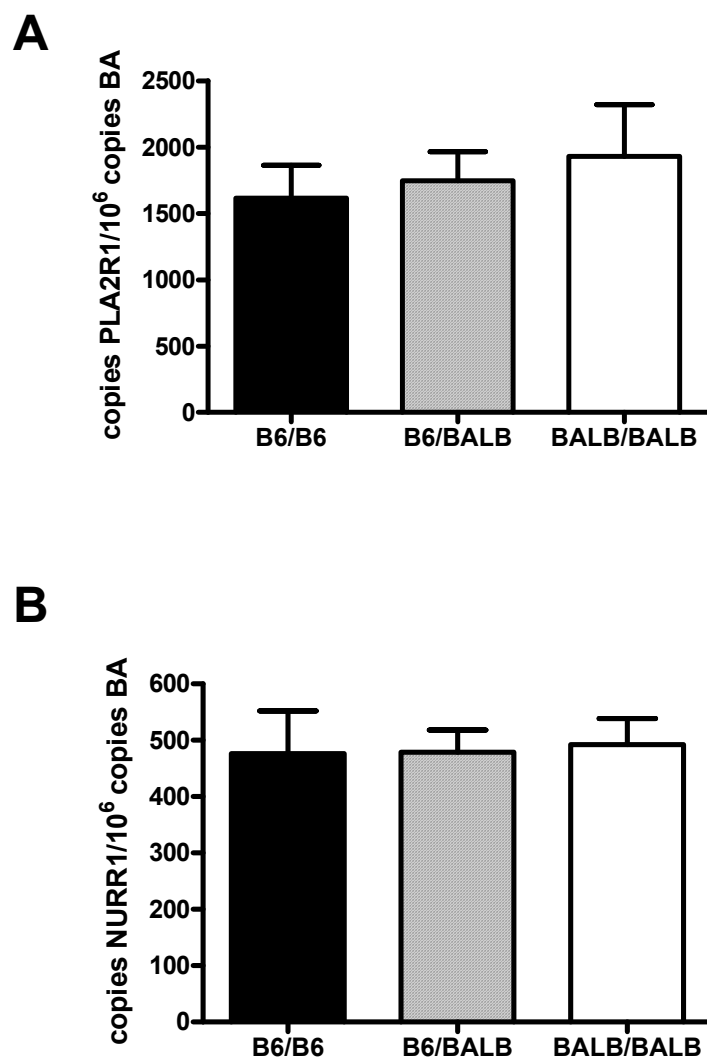
(A) lesion size in female animals; (B) lesion size in male animals; (C) lesion size in F2 male and females animals from different subcrosses: F2a animals were generated by crossing male B6.LDLR^{-/-} mice with female BALB.LDLR^{-/-} mice and crossing the resulting F1s; F2b animals were generated by crossing male BALB.LDLR^{-/-} mice with female B6.LDLR^{-/-} mice and crossing the resulting F1s.

Supplemental Figure II:



Supplemental Figure II: Correlation of plasma plant sterol levels (brassicasterol) with plasma levels of (A) LDL-C and (B) VLDL-C

Supplemental Figure III:



Supplemental Figure III: mRNA expression of chromosome 2 candidate genes (A) *Pla2r1* and (B) *Nurr1* (*Nr4a2*) in male F2 mice based on allele status at marker D2Mit7

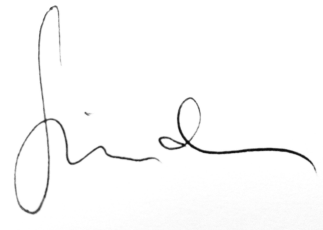
I. Anhang

I.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

19.12.2011

.....
Datum



.....
Unterschrift

I.3 Publikationen

“Constrictive pericarditis presenting as a large mediastinal mass causing functional tricuspid and pulmonary stenosis”

Ehl NF, Sündermann S, Geyer R, Thies S, Epp C, Weilenmann D, Falk V, Joerg L, Rickli H, Maeder MT.

Circulation. 2011 Nov 8;124(19):e487-91.

“One-year follow-up of patients undergoing elective cardiac surgery assessed with the Comprehensive Assessment of Frailty test and its simplified form”

Sündermann S, Dademasch A, Rastan A, Praetorius J, Rodriguez H, Walther T, Mohr FW, Falk V.

Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2011 Aug;13(2):119-23; discussion 123. Epub 2011 Mar 4.

“Off-pump surgery for the poor ventricle?”

Emmert MY, Salzberg SP, Theusinger OM, Rodriguez H, Sündermann SH, Plass A, Starck CT, Seifert B, Baulig W, Hoerstrup SP, Jacobs S, Grünenfelder J, Falk V.

Heart Vessels. 2011 May 17 (Epub ahead of print).

“Cosegregation of aortic root atherosclerosis and intermediate lipid phenotypes on chromosomes 2 and 8 in an intercross of C57BL/6 and BALBc/ByJ low-density lipoprotein receptor-/- mice”

Burkhardt R, Sündermann S, Ludwig D, Ceglarek U, Holdt LM, Thiery J, Teupser D. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 Apr;31(4):775-84. Epub 2011 Jan 20.

“Port implantation into the aortic arch: an unusual complication requiring urgent cardiac surgery”

Emmert MY, Sündermann S, Falk V, Wilhelm MJ.

Eur J Cardiothorac Surg. 2011 Apr;39(4):611. Epub 2010 Sep 17.

“Severe traumatic tricuspid insufficiency detected 10 years after blunt chest trauma”

Emmert MY, Pretre R, Sündermann S, Weber B, Bettex DA, Hoerstrup SP, Falk V.

Clin Res Cardiol. 2011 Feb;100(2):177-9. Epub 2010 Sep 15.

“Renaissance of surgery for coronary artery disease”

Sündermann SH, Salzberg SP.

Praxis (Bern 1994). 2011 Jan 5;100(1):23-8.

“Comprehensive assessment of frailty for elderly high-risk patients undergoing cardiac surgery.”

Sündermann S, Dademasch A, Praetorius J, Kempfert J, Dewey T, Falk V, Mohr FW, Walther T.

Eur J Cardiothorac Surg. 2011 Jan;39(1):33-7.

I.4 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. med. Daniel Teupser, dem Betreuer der Doktorarbeit, für die Bereitstellung des Themas, für die Betreuung während der Arbeit, für die Fertigstellung des Manuskripts und für das Korrekturlesen der Dissertation.

Dr. med. Ralph Burkhardt für die riesige Mithilfe bei den Versuchen und für die unermüdlichen Bemühungen um die Fertigstellung des Manuskripts und der Dissertation trotz Aufenthalts in den USA. Die Arbeit wäre wohl sonst noch nicht fertig.

Prof. Dr. med. Joachim Thiery, Direktor des Instituts für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik für die Anstellung als Doktorand und die Unterstützung der Arbeit.

Allen technischen Mitarbeitern, vor allem Wolfgang Wilfert, Franziska Jeromin und Claudia (geb.) Weise für gutes Anlernen, Beantwortung aller noch so dummen Fragen am Anfang und natürlich die viele Arbeit, die sie in das Projekt investiert haben. Außerdem allen Mitarbeitern des MSZ, die für die Pflege und Aufzucht der Mäuse gesorgt haben.

Zuletzt und am meisten möchte ich Denen danken, die mir am wichtigsten sind:

Meiner Frau Claudia, die ich nicht kennen gelernt hätte wenn ich die Doktorarbeit an einer anderen Einrichtung durchgeführt hätte, die einerseits viel im Labor für das Projekt gearbeitet hat und vor allem nicht enttäuscht war wenn ich wieder hinter dem Schreibtisch verschwunden bin um die Arbeit fertig zu stellen.

Und natürlich meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben mein Studium erfolgreich zu beenden und trotzdem die viele Zeit im Labor zu verbringen ohne mir darüber Sorgen machen zu müssen, wie ich mein nächstes Essen in der Kantine bezahle.

Dies sind die Personen, die am meisten zum Gelingen beigetragen haben. Danke natürlich auch allen Anderen, die Energie in das Projekt gesteckt haben. Es sind zu viele um alle einzeln zu erwähnen.